



---

# **Bachelorarbeit**

---

Frau  
**Stefanie Urbanek**

**Untersuchungen zum  
Biofilmwachstum auf  
verschiedenen textilen  
Aufwuchsträgern**

Mittweida, 2014

## **Bachelorarbeit**

---

# **Untersuchungen zum Biofilmwachstum auf verschiedenen textilen Aufwuchsträgern**

Autor:  
**Frau**

**Stefanie Urbanek**

Studiengang:  
**Biotechnologie/Bioinformatik**

Seminargruppe:  
**BI11w1-B**

Erstprüfer:  
**Frau Prof. Dr. Petra Radehaus**

Zweitprüfer:  
**Herr Diplom-Biologe Jens Mählmann**

Einreichung:  
**Mittweida, 15. September. 2014**

Verteidigung/Bewertung:  
**Mittweida, 2014**

## **BACHELOR THESIS**

---

# **Studies on Biofilm Growth on Various Textile Materials**

author:  
**Ms.**

**Stefanie Urbanek**

course of studies:  
**Biotechnology / Bioinformatics**

seminar group:  
**BI11w1-B**

first examiner:  
**Prof. Dr. Petra Radehaus**

second examiner:  
**Mr. Diplom-Biologe Jens Mählmann**

submission:  
**Mittweida, 15. September. 2014**

defence/ evaluation:  
**Mittweida, 2014**

## **Bibliografische Beschreibung:**

Urbanek, Stefanie:

Untersuchungen zum Biofilmwachstum auf verschiedenen textilen

Aufwuchsträgern. - 2014.- 9 S. Verzeichnisse, 57 S. Inhalt, 2 S. Anhänge

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik, Naturwissenschaften,  
Informatik, Bachelorarbeit, 2014

## **Englischer Titel**

Studies on Biofilm Growth on Various Textile Materials

## **Kurzbeschreibung:**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Biofilmwachstum auf Basaltfaser, Glasfaser und Polyesterfaser verglichen. Ausgehend von den Fasern wurden diese als Aufwuchsträger in Form eines Gewebes verarbeitet. Um die verschiedenen Aufwuchsträger hinsichtlich ihrer Eignung zu bewerten, wurde eine Beschreibung der Biofilmentwicklung vorgenommen, die Zellzahl aus den Biofilmausschnitten und die Biomasse auf den Geweben bestimmt. Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen auf den Polyester-Geweben das geringste Biofilmwachstum. Auf den Basaltgeweben konnte die stärkste Biofilmentwicklung nachgewiesen werden. Die Untersuchungsergebnisse der Glasgewebe lagen im Mittelfeld. Schlussfolgernd wurde die Abhängigkeit der Biofilmentwicklung von dem Material- und dem Struktureinfluss der Aufwuchsträger festgestellt. Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung der Berieselungswässer wurden mit der Acridinorangefärbung der Zellen aus Biofilmausschnitten aufgezeigt.

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Radehaus für die freundliche und hilfsbereite Betreuung bei der Anfertigung der Bachelorarbeit bedanken.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Sächsischen Textilforschungsinstitut e.V. Chemnitz bedanken, die mit ihrer persönlichen und fachlichen Unterstützung zum Gelingen dieser Abschlussarbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Mählmann für die Bereitstellung des interessanten Themas und die fachliche Betreuung.

Weiterhin danke ich der Südsachsen Wasser GmbH in Chemnitz für die unkomplizierte und freundliche Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während meines Studiums in allen Angelegenheiten unterstützt und motiviert hat.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1      Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1      Abluftreinigungsanlagen der Flammkaschierfirmen C.H. Müller GmbH und Vowalon® Beschichtung GmbH.....	1
1.2      Bakterielle Adhäsion an eine Materialoberfläche .....	2
1.3      Biofilmentwicklung .....	4
1.4      Materialvorstellung.....	7
1.4.1      Chemiefaser – Polyesterfaser.....	7
1.4.2      Mineralfaser – Basaltfaser .....	8
1.4.3      Mineralfaser – Glasfaser .....	9
1.4.4      Übersicht über die Struktur der Gewebe .....	9
<b>2      Zielstellung.....</b>	<b>16</b>
<b>3      Material.....</b>	<b>17</b>
3.1      Chemikalien .....	17
3.2      Medien.....	17
3.3      Material.....	17
3.4      Geräte.....	18
<b>4      Methoden .....</b>	<b>19</b>
4.1      Versuchsaufbau .....	19
4.2      Bestimmung der Zellzahlen aus einem Biofilmausschnitt .....	21
4.3      Bestimmung der Gesamtbiomassen auf den Aufwuchsträgern .....	23

4.4	Anfärbung von Zellen aus einem Biofilmausschnitt mit der Acridinorange-Färbung.....	23
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
5.1	Biofilmentwicklung auf den Aufwuchsträgern.....	25
5.1.1	Einfluss der wirkenden Scherkräfte auf das Biofilmwachstum am Beispiel von Basaltgewebe .....	25
5.1.2	Biofilmwachstum auf den Basalt-, Glas- und PES-Geweben im zeitlichen Verlauf .....	28
5.1.3	Einfluss der Struktur des Gewebes auf das Biofilmwachstum .....	34
5.2	Untersuchungen auf Zellebene .....	36
5.2.1	Zellzahlbestimmung aus Biofilmausschnitten .....	36
5.2.2	Gesamtbiomassenbestimmung auf den Geweben .....	40
5.2.3	Anfärben der Zellen aus den Biofilmausschnitten mit Acridinorange .....	38
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>42</b>
6.1	Biofilmentwicklung auf den Aufwuchsträgern.....	42
6.2	Untersuchungen auf Zellebene .....	48
6.3	Gesamtbiomassebestimmung.....	51
6.4	Bewertung der angewendeten Methoden .....	52
<b>7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>58</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>61</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>64</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>66</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Abluftreinigungsanlage der Flammkaschierfirma CHM.....	1
Abbildung 2	Phasen der Entwicklung von Biofilmen auf Materialoberflächen .....	5
Abbildung 3	Polykondensationsreaktion zur Herstellung von Polyester .....	8
Abbildung 4	Herstellung einer textilen Fläche als Gewebe .....	10
Abbildung 5	Grundbindungsarten in Geweben.....	10
Abbildung 6	Darstellung der Oberflächenstruktur des PES-Gewebes.....	11
Abbildung 7	Darstellung der Oberflächenstruktur des Basaltleinwandgewebes 1 ... .....	12
Abbildung 8	Darstellung der Oberflächenstruktur des Basaltleinwandgewebes 2... .....	13
Abbildung 9	Darstellung der Oberflächenstruktur des Basaltleinwandgewebes 3... .....	14
Abbildung 10	Darstellung der Oberflächenstruktur des Glasgewebes .....	14
Abbildung 11	Gewebepositionierung in Kultivierungsgefäßen .....	20
Abbildung 12	Darstellung einer Thoma-Zählkammer und Skalierung eines A-Feldes einer Zählkammer .....	22
Abbildung 13	Darstellung der Farbstoffverteilung innerhalb von einer Minute .....	25
Abbildung 14	Darstellung der wirkenden Scherkräfte am Beispiel des mit Klebestreifen versehenen Basaltgewebes 1 (Vow) .....	27
Abbildung 15	Darstellung der wirkenden Scherkräfte am Beispiel des mit Klebestreifen versehenen Basaltgewebes am Versuchsende (Vow).....	28
Abbildung 16	Biofilmwachstum auf der Basaltleinwandprobe (CHM) .....	29
Abbildung 17	Mikroskopische Aufnahme des Basaltgewebes bei 100x Objektiv- vergrößerung (CHM) .....	30
Abbildung 18	Biofilmwachstum auf dem Glasgewebe (CHM) .....	31
Abbildung 19	Biofilmg auf dem Glasgewebe (CHM).....	32
Abbildung 20	Biofilmwachstum auf dem PES-Gewebe (CHM) .....	33
Abbildung 21	Ausschnitt aus dem PES- Gewebe (CHM).....	34



---

Abbildung 22	Gegenüberstellung der Basaltgewebe mit Leinwandbindung und kombinierter Leinwand-Köperbindung einer Vow-Probe am Versuchsende .....	35
Abbildung 23	Darstellung der Ausplattierungsergebnisse von Biofilmausschnitten .....	38
Abbildung 24	Ergebnis der Acridinorangefärbung unter Blaulichtanregung der Basaltbiofilmprobe.....	41
Abbildung 25	Bestimmung der Biomassen auf den Geweben (CHM).....	39
Abbildung 26	Bestimmung der Biomassen auf den Geweben (Vow).....	40

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Wichtige Komponenten der Biofilmentwicklung sowie deren Eigenschaften nach Höll, 2010 .....	6
Tabelle 2	Zusammenfassung der wichtigsten Eigenschaften der Gewebe.....	15
Tabelle 3	Zellzahlbestimmung der Biofilmausschnitte von CHM und Vow.....	36
Tabelle 4	Morphologische Unterschiede der Agarplatten von CHM und Vow.....	37
Tabelle 5	Ergebnisse der Acridinorangefärbung von CHM und Vow .....	41

**Abkürzungsverzeichnis**

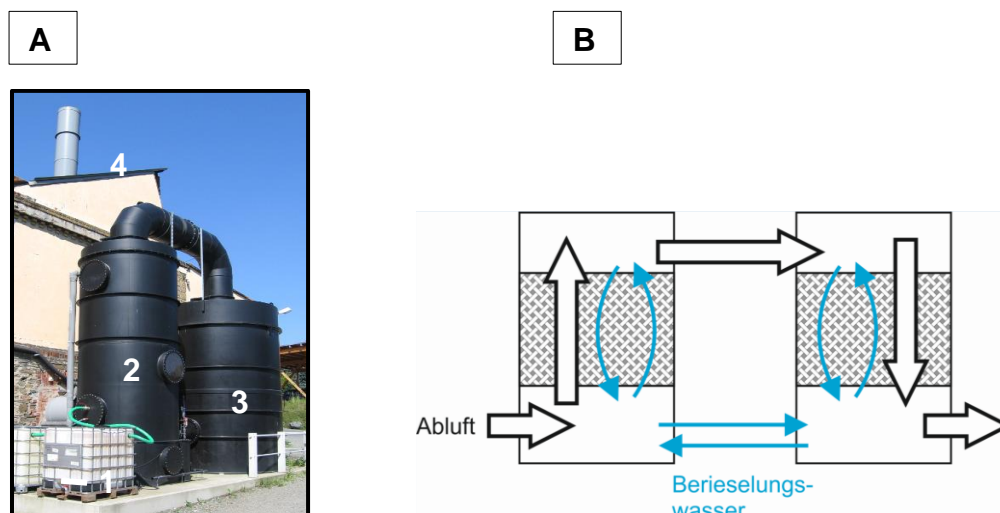
CHM	C.H. Müller GmbH (Netschkau/Sachsen)
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanz
KBE	Koloniebildende Einheiten
n	Stichprobenanzahl
PES	Polyester
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
STFI	Sächsisches Textilforschungsinstitut e.V. Chemnitz
TS-Agar	Trypton-Soja-Agar
Vow	Vowalon® Beschichtung GmbH (Treuen /Sachsen)

# 1 Einleitung

## 1.1 Abluftreinigungsanlagen der Flammkaschierfirmen

### C.H. Müller GmbH und Vowalon® Beschichtung GmbH

In den Produktionsprozessen der Firmen C.H. Müller GmbH (im Folgenden als CHM abgekürzt) und Vowalon® Beschichtung GmbH (im Folgenden als Vow abgekürzt) wird bei der Flammkaschierung eine Substratoberfläche (meist Polyurethanschäume) mit einer offenen Flamme angeschmolzen und mit einem Bezugsstoff zusammengefügt [Giessmann, 2010]. Die während des Produktionsprozesses freigesetzte, cyanidhaltige Abluft wird in die Abluftreinigungsanlagen eingeleitet. Die Anlage besteht aus zwei Festbettreaktoren (in Abbildung 1A: 2 und 3). In diesen Reaktoren sind Mikroorganismen auf Aufwuchsträgern fixiert, die u.a. in der Lage sind, das Cyanid in der Abluft abzubauen. Die Berieselungswässer zirkulieren mit oder gegen die Abluftströmung (Abbildung 1, B, blaue Pfeile). Mit Hilfe der Mikroorganismen wird die Abluft biologisch gereinigt und über den Schornstein in die Atmosphäre entlassen (Abbildung 1; (4)). In Abbildung 1 ist die Abluftreinigungsanlage der Firma CHM aufgezeigt.



**Abbildung 1** Abluftreinigungsanlage der Flammkaschierfirma CHM

**A:** Abluftreinigungsanlage. Die Abluft aus dem Produktionsbetrieb (1) wird in die Festbettreaktoren ((2,3)) der Abluftreinigungsanlage eingeleitet. Nach der biologischen Abluftreinigung wird die Abluft in die Atmosphäre entlassen. **B:** Schematische Darstellung der Zirkulation der Abluft und der Berieselungswässer.

Die Abluftreinigungsanlagen von CHM und Vow weisen Leistungsunterschiede in der Cyanidelimination der Abluft auf. Die Abluftreinigungsanlage von CHM zeigt eine deutlich höhere Eliminationsrate von Cyanid (80-90%, Zeitraum Januar 2009-August 2014) im Vergleich zu der Anlage von Vow (ca. 30-40%ige Eliminationsrate, Zeitraum Januar 2009-August 2014) bei stärkeren Werteschwankungen auf [persönliche Mitteilung Herr Mählmann, STFI]. Bakterien (Cyanidabbauer) sind Bestandteile der Biozönose der Festbettreaktoren. Die Zusammensetzung und das Verhalten der Bakterienpopulation könnten zu den vorhandenen Unterschieden führen. Die aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse der Aufwuchsversuche sollen der Optimierung der Leistungsfähigkeit der Abluftreinigungsanlagen, zum Beispiel durch die Entwicklung geeigneter Trägermaterialien dienen.

## **1.2 Bakterielle Adhäsion an eine Materialoberfläche**

Der Adhäsion der Mikroorganismen an einer Oberfläche gehen der Transport der Organismen mittels verschiedener Mechanismen - der Diffusion und der konvektive Transport - voraus. Der Hauptmechanismus des Transportes der Mikroorganismen, der konvektive Transport, basiert auf den Strömungen der umgebenden Flüssigkeit. Für das Passieren der Diffusionsgrenzschichten ist dieser Mechanismen ungeeignet, aber die Transportgeschwindigkeit ist im Vergleich zu dem diffusiven Transport höher. Mit der Diffusion können die Diffusionsgrenzschichten (Dicke ca. 10-100  $\mu\text{m}$ ) mit einer Bewegungsgeschwindigkeit von ca. 40  $\mu\text{m}/\text{h}$ , in denen kein konvektiver Transport erfolgt, überwunden werden. Die Größe der Diffusionsgrenzschichten überschreiten die Abmessungen der Mikroorganismen. Aus diesem Grund ist der diffusive Transport der Organismen an die Materialoberfläche für die Herstellung des direkten und unspezifischen Oberflächenkontaktes wichtig [Rumpf, 2009].

Die primäre Adhäsion, die erste Phase der Biofilmentwicklung, ist ein physiko-chemischer Prozess und beschreibt die Annäherung und Anheftung von Mikroorganismen an eine Oberfläche. Als Einflussfaktoren für die Primäradhäsion können die Struktur der mikrobiellen Oberfläche, das Substratum (Material) und das Medium genannt werden. Die Oberflächenladung und Hydrophobizität der bakteriellen Oberfläche können je nach Wachstumsphase, Ernährungszustand und anderen äußeren Faktoren variieren. Für die Adhäsionsprozesse sind die

Wechselwirkungen der verschiedenen Einflussfaktoren untereinander auf die Primäradhäsion zu berücksichtigen.

In Abhängigkeit der Eigenschaften der Kontaktpartner, ihren Kontaktabstand und äußeren Einflussfaktoren werden die ablaufenden Adsorptionsprozesse von grundlegenden Kräften beeinflusst:

- Van der Waals Kräfte (Reichweite  $> 50$  nm)
- elektrostatische Kräfte (Reichweite 2 - 20 nm)
- hydrophobe Wechselwirkungen (Reichweite 0,5 - 2 nm)
- Brownsche Molekularbewegung.

Die wirkenden Kräfte sind proportional zu dem Kehrwert des Abstandes der geladenen Teilchen der Material - und Bakterienoberfläche. Bei Annäherung der Organismen an eine Oberfläche können bei einer Reichweite von unter 10 nm Ionen direkt zwischen der Bakterienoberfläche und der Materialoberfläche wechselwirken. So kann aus der Anziehung von gegensätzlicher Ladung eine hohe Bindungsstärke resultieren. Die Bestimmung der Oberflächenladung (Zetapotential) der Bakterienzelle erfolgt über die elektrophoretische Mobilität der Zelle in einer Lösung in Abhängigkeit des pH-Wertes. Treten Ladungen an Materialoberflächen auf, können diese durch Adsorption gelöster Ionen aus dem Medium durch Adsorption von gegensätzlichen Ionen neutralisiert werden. Aufgrund der hohen Leitfähigkeit der in dem Versuchsaufbau verwendeten Nährbouillons (spezifische Leitfähigkeit circa  $1100 \mu\text{S/cm}$ ) könnten die Ladungs- und Beladungsprozesse an der Materialoberfläche möglicherweise auftretende Ladungsunterschiede zeitnah ausgeglichen haben [Persönliche Mitteilung Herr Vogel, STFI; Raith, 2006].

Die heterogene, dreidimensionale Bakterienoberflächenstruktur weist eine komplexe chemische Zusammensetzung auf. Die für Organismen oder Organismengruppen typischen Strukturelemente, zum Beispiel die Carboxylgruppen der Teichonsäuren, beeinflussen die makroskopische Eigenschaft der Mikroorganismen hinsichtlich der Hydrophobizität oder der elektrostatischen Eigenschaften. Zusätzlich können art- und zellinientypische Zellwandstrukturen beispielsweise Saccharide und Proteinstrukturen oder auf der Zelloberfläche aufgelagerte Kapseln bei der Anheftung

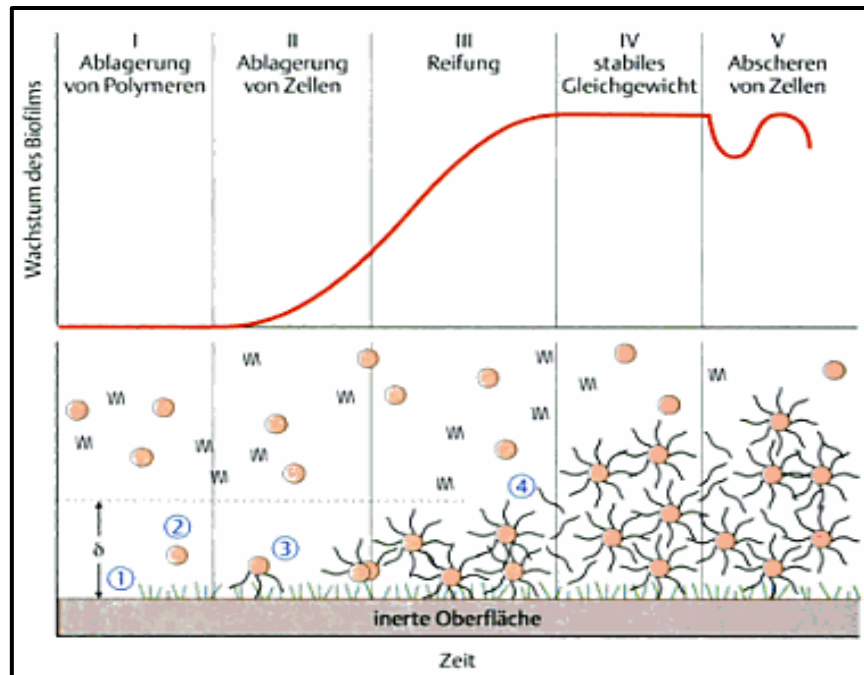
wirksam werden. In der Literatur wird die Bakterienoberfläche bei den meisten Organismen unter physiologischen Bedingungen mit einer negativen Nettoladung beschrieben [Fuchs, 2007].

Ein einheitlicher Adhäsionsmechanismus kann aufgrund der Komplexität der Wechselwirkungen nicht beschrieben werden. Es ist bekannt, dass bei Vorliegen von hydrophilen und hydrophoben Oberflächen bei einem Mikroorganismus verschiedene Anhaftmechanismen auftreten. Die Erforschung von detaillierten Informationen über die molekulare und genetische Basis der Biofilmentwicklung gelang bisher nur bei wenigen Bakterienarten so z.B. bei *P.aeruginosa* [Rumpf, 2009; Venzmer, 2008; Höll 2010].

### **1.3 Biofilmentwicklung**

Biofilme sind definiert als auf Oberflächen anhaftende und wachsende Lebensgemeinschaften von Bakterien, Pilzen, Protozoen und Algen. Eine Grenzfläche mit ausreichendem Flüssigkeitskontakt kann mit Mikroorganismen besiedelt werden. Die drei nacheinander ablaufenden Schritte der Adhäsion/Anheftung von Mikroorganismen an einer Substratoberfläche, die Vermehrung und Ausbildung zu Mikrokolonien und das Entstehen von differenzierten Biofilmen bilden die Grundlage für die Biofilmentwicklung. Die Voraussetzungen sind das Vorhandensein einer Grenzfläche (Aufwuchsfläche/Medium), Nährstoffe, Mikroorganismen und eine Flüssigkeit [Roeske, 2007].

Für eine erfolgreiche Kontaktaufnahme der Mikroorganismen zu einer Oberfläche muss diese mit Proteinen, Polysacchariden und Huminstoffen irreversibel bedeckt sein (Ausbildung des „conditioning films“) (Abbildung 2, I). In der Abbildung 2 sind die Phasen der Entwicklung von Biofilmen dargestellt.



**Abbildung 2 Phasen der Entwicklung von Biofilmen auf Materialoberflächen**

Die Phasen I - V beschreiben die Entwicklung eines Biofilms.  $\delta$  beschreibt die diffusive Grenzschicht. Kreise symbolisieren die Bakterien bzw. die Bakterien mit den ausgebildeten Pili oder Fimbrien. Die Polymere für die Beschickung der Oberfläche sind als  $\text{WM}$  dargestellt. (1) Beschichtung der Oberfläche mit Huminstoffen, Proteinen und Polysacchariden (2) reversible Anheftung von Bakterien an Oberfläche (3) Intensivierung des Kontaktes (irreversibel) zwischen Mikroorganismen und Oberfläche (4) weitere Anheftung von Zellen [Fuchs, 2007]

Der reversible Vorgang der Anhaftung von Zellen an einer Oberfläche erfolgt im zweiten Schritt z.B. durch elektrostatische Kräfte oder falls vorhanden Flagellen (Abbildung 2, II). Eine Intensivierung der Kontaktaufnahme erfolgt mit den aktiven Vorgängen der Veränderung der Zelloberflächenstruktur oder der Ausbildung von spezifischen Adhäsionsproteinen, Polysacchariden und Fimbrien bzw. Pili. Die Zellen lagern sich aufgrund der zunehmenden Wechselwirkung zwischen Bestandteilen der Zelloberfläche mit der Oberfläche irreversibel auf dieser Fläche ab (Abbildung 2, III). Die weitere Anlagerung von Zellen führt zu einem exponentiellen Wachstum und zu einer Reifung des Biofilms (Abbildung 2, IV). Die Freisetzung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) in Form von Proteinen, Polysacchariden und Nucleinsäuren stabilisiert den sich entwickelnden Bakterienrasen. In Abhängigkeit eventuell vorhandener hydrodynamischer Effekte z.B. wirkenden Scherkräften können sich Zellen von der Oberfläche ablösen (Abbildung 2, V). Demzufolge variiert



die Biofilmdicke von wenigen Mikrometern bis zu Millimetern [Fuchs, 2007; Höll, 2010].

Tabelle 1 fasst die drei Phasen Medium, Substratum/Material, Mikroorganismen und deren beeinflussende Faktoren, die für die Entwicklung eines Biofilms maßgebend sind, zusammen.

**Tabelle 1      Wichtige Komponenten der Biofilmentwicklung sowie deren Eigenschaften**

Phasen	Phasen beeinflussende Faktoren
Medium (flüssige Komponenten)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatur</li> <li>• pH-Wert</li> <li>• gelöste organische und anorganische Stoffe</li> <li>• hydrodynamische Parameter (z.B. Druck, Scherkräfte, Turbulenzen)</li> </ul>
Substratum (feste Komponenten)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chemische Zusammensetzung</li> <li>• Hydrophobizität</li> <li>• Polarität und Oberflächen-spannung</li> <li>• „biologische Affinität“: Besiedelbarkeit, Rauigkeit, Porosität, Benetzbarkeit</li> </ul>
Mikroorganismen (erst partikuläre, später gelförmige Komponenten)	<p>Entwicklung im Biofilm erfolgt in Abhängigkeit:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• der EPS</li> <li>• dem Ernährungszustand</li> <li>• der Polarität der Zelloberfläche</li> <li>• der Art, der Wachstumsphase und der Zellzahl</li> </ul>

[Höll, 2010]

Die Entwicklung und die Aktivität von Mikroorganismen in einem Biofilm sind im Wesentlichen von der qualitativen und der quantitativen Versorgung mit Nährstoffen abhängig. Zudem beeinflussen die Geschwindigkeit der umströmenden Flüssigkeit

und die hydrodynamischen Faktoren diese Wechselwirkung. Die Grundlage für die Substratversorgung der Mikroorganismen liefern Einschlüsse der sie umgebenden gelartigen Matrix, der sogenannten Extrazellulären Polymeren Substanz (EPS). Die EPS schützt die Organismen u.a. vor pH-Extremen, toxischen Metallionen und teilweise vor Austrocknung. Als Bestandteile sind geladene (meist anionische) oder neutrale Proteine und Polysaccharide, Anteile an Nucleinsäuren, Lipide und andere Makromoleküle zu nennen [Schmid, 2003].

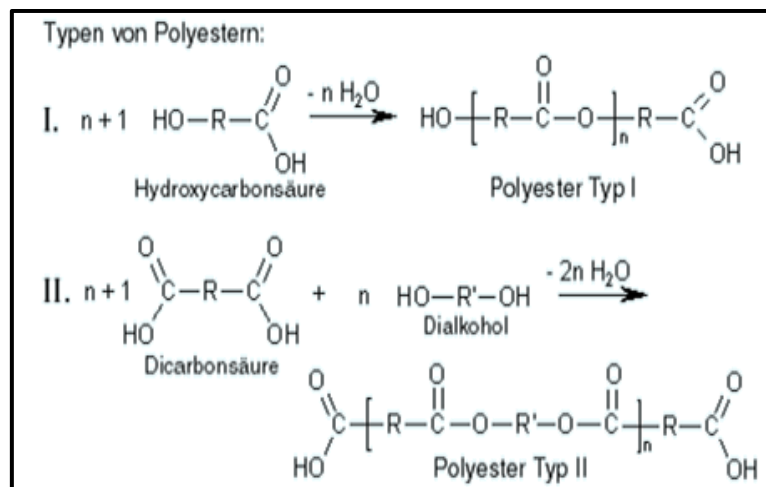
## **1.4 Materialvorstellung**

Als Kriterien für die Vergleichbarkeit der Verarbeitung der Garne auf einer Bandwebmaschine der Firma Saurer sollten die Ähnlichkeit der chemischen und physikalischen Eigenschaften, der Kostenfaktor und die Verarbeitbarkeit ohne Verlust der Materialeigenschaften herangezogen werden. Je nach Herkunft der Fasern werden diese in Natur- und Chemiefasern eingeteilt. Aus dem Bereich der Naturfasern (hier: Mineralfasern) wurden die Basalt- und Glasfasern und stellvertretend für die Chemiefasern (vollsynthetische Chemiefasern) die Polyesterfasern (PES-Faser) für die Weiterverarbeitung als Garn verwendet [Kalweit, 2012].

### **1.4.1 Chemiefaser – Polyesterfaser**

Der Herstellungsprozess der Polyesterfaser wird als Schmelzspinnverfahren bezeichnet. Als chemische Grundelemente bestehen diese Fasern im Wesentlichen aus Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Wasserstoff. Polyester ist ein biologisch abbaubarer und aus fossilen Rohstoffen hergestellter Kunststoff. Bioabbaubarkeit bedeutet, dass das Material mit Hilfe von Mikroorganismen nach einer festgeschriebenen Zeit unter definierten Umweltbedingungen (z.B. unter Beachtung der Temperatur, Sauerstoffgehalt) zu Biomasse, Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut wird. In der Regel wird die Bioabbaubarkeit durch eine gute Benetzbarkeit des Materials oder eine gute Wasseraufnahmefähigkeit beschleunigt [Pfeil, 1994]. Die Dichte der Faser wird bei 20 °C unter Normklima mit 1,4 g/cm<sup>3</sup> angegeben [Koslowski, 2008].

Als Polyester werden Moleküle bezeichnet, bei denen Monomere unter Ausbildung von Esterbindungen zu Polymeren reagieren. Polyester entsteht durch eine Polykondensationsreaktion der Terephthalsäure (aromatische Dicarbonsäuren) bzw. ihren Estern mit Ethylenglycol oder 1,4 Dimethylcyclohexan (bifunktionellen Alkoholen oder Oxycarbonsäuren). Man benötigt mindestens zwei funktionelle Gruppen pro Monomer für die Ausbildung eines Polyesters. Polyester-Typ 1 entstehen aus Hydroxycarbonsäuren. Bei der Reaktion von Dicarbonsäuren mit Dialkoholen werden diese als Polyester Typ-2 bezeichnet [Breitmaier et al., 2012; Koslowski, 2008].



**Abbildung 3 Polykondensationsreaktion zur Herstellung von Polyester**

Polykondensationsreaktion aus Dicarbonsäuren (bzw. ihren Estern) mit bifunktionellen Alkoholen oder Oxycarbonsäuren.

[URL-1:lbld, Stefan: Herstellung von Kunststoffen-Polykondensation. URL: <http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/kunststoffe/pkond.htm>, Zugriff am 15.09.2014]

#### 1.4.2 Mineralfaser – Basaltfaser

Die zu den Mineralfasern gehörenden **Basaltfasern** sind aus dem basischen (Dominanz der Oxide - Magnesium-, Calcium- und Chrom) Vulkangestein Basalt hergestellt. Die Technologie für die Produktion der grün-braunen Basaltfaser wurde in den 1960 er Jahren in der ehemaligen Sowjetunion entwickelt.

Die chemische Zusammensetzung der Basaltfaser variiert je nach Standort des verwendeten Basaltgesteins. Die typische Zusammensetzung kann folgendermaßen beschrieben werden: SiO<sub>2</sub> (52,8 %), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (17,5 %), Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10,3 %), MgO (4,63 %), CaO (8,59 %), Na<sub>2</sub>O (3,34 %), K<sub>2</sub>O (1,46 %), TiO<sub>2</sub> (1,38 %), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (0,28 %),

MnO (0,16 %), Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,06 %). Der Quarzgehalt kann hierbei einen Wert von 20 % betragen [URL-1]. Die Dichte einer Basaltfaser (bei 20 °C) und Normklima wird mit 2,6 - 2,8 g/cm<sup>3</sup> angegeben.

Die Herstellung der Basaltfasern erfolgt bei 1400-1500 °C in der Basaltschmelze. Die in dem Produktionsprozess entstehenden Fasern werden aus Gründen der Stabilität und Elastizität mit Hilfe einer Überschichtung, der sogenannten Schlichte, überzogen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Basaltgarn der Firma Incotology enthält Silan als Schlichte. Der Schlichteanteil beträgt 0,4-0,8 % [URL-2]. Die überschichteten Filamente (= Fasern mit Mindestlänge von 1000 mm) werden in Bündeln zu Rovings zusammengeführt. Als ein Roving wird ein Garn mit parallel angeordneten Filamenten bezeichnet [Lienhard, 2010].

#### **1.4.3 Mineralfaser – Glasfaser**

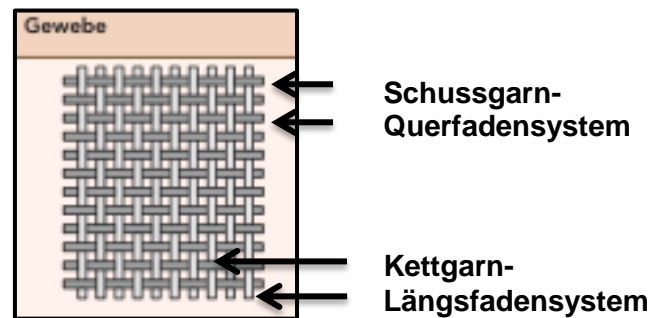
Die Herstellung der Glasfaser erfolgt durch eine Glasschmelze. Die chemische Zusammensetzung und die damit verbundenen Materialeigenschaften variieren je nach Zusammensetzung des Glasrohstoffes. Folgende Richtwerte gelten: SiO<sub>2</sub> (53-55 %), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (14-15 %), B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (6-8 %), CaO (17-22%), MgO (< 5 %), K<sub>2</sub>O und Na<sub>2</sub>O < 1 % und andere Oxide ca. 1% [URL-3]. Eine Glasfaser kann über eine Dichte von 2,6 – 2,8 g/cm<sup>3</sup> (bei 20 °C) verfügen.

Für den mechanischen Schutz werden die Glasfasern in dem nachfolgenden Verarbeitungsprozess mit einer Schlichte überzogen. In der Forschungsarbeit fanden die Glasfasern der Firma R&G Faserverbundwerkstoffe GmbH Anwendung. Laut Herstellerangabe verwenden diese Silan als Schlichte. Der Schlichteanteil beträgt 0,5 - 1,5%.

#### **1.4.4 Übersicht über die Struktur der Gewebe**

Garn ist ein Oberbegriff für lineare textile Materialien. Es setzt sich aus verdrehten Faserbündeln zusammen. Ein Garn kann in Abhängigkeit des Produktionsprozesses u.a. aus einem Filament (Monofilgarn) und mehreren Filamenten (Multifilgarn) aufgebaut sein. Die Garne wurden als textile Fläche, dem Gewebe, verarbeitet. Bei dieser Form der textilen Fläche kreuzen sich ein Längsfadensystem (das sogenannte

Kettgarn, Abbildung 4) und ein Querfadensystem (das sogenannte Schussgarn, Abbildung 4) rechtwinklig. Ein Faden kann als Garn zusammengefasst werden. Die Eigenschaft eines Gewebes kann folgendermaßen beschrieben werden: formstabil, wenig elastisch und dehnfähig. Des Weiteren verfügt es über ein geringes Porenvolumen. Geweberänder bzw. Schnittkanten können als feste Kanten gewebt werden [Wallbaum et al., 2006]. Aus technischen Gründen wurde bei der Glasgewebe-Probe auf ein bereits vorgefertigtes Produkt zurückgegriffen.



**Abbildung 4 Herstellung einer textilen Fläche als Gewebe**

Die Herstellung eines Gewebes basiert auf ein Längs- und Querfadensystem.  
[Wallbaum et al., 2006]

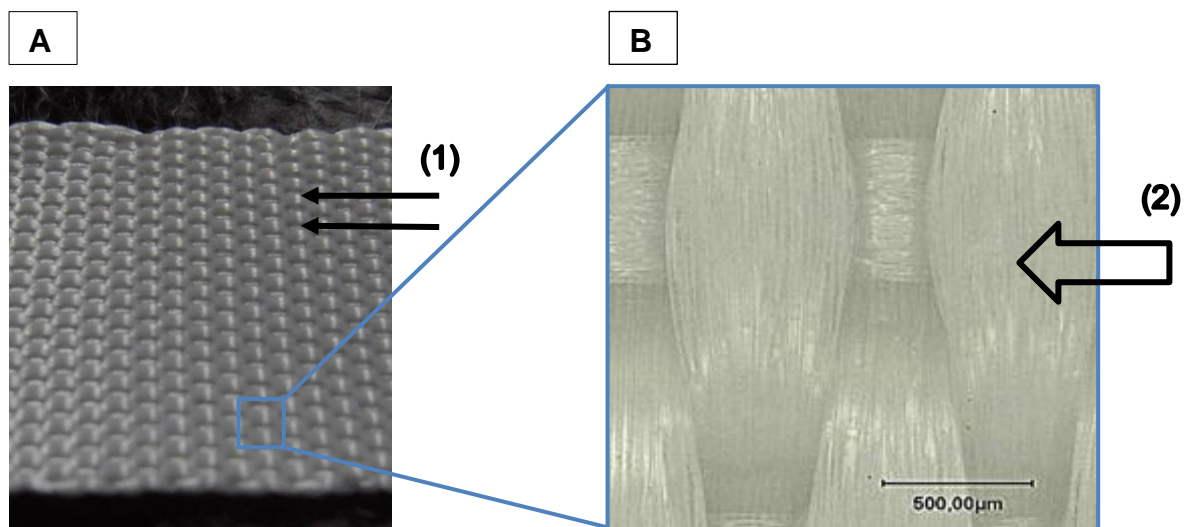
Als Grundbindungsart wurde die Leinwandbindung und für die Auswertung hinsichtlich der Unterschiede in der Oberflächenstruktur eine kombinierte Leinwand- / Körperbindung gewählt. Abbildung 5 stellt die Bindungsarten grafisch gegenüber. Charakteristisch für eine Leinwandbindung ist die abwechselnde Abfolge eines Kettgarns über bzw. unter einen Schussgarn (Abbildung 5, A). Typisch für eine Körperbindung sind die seitig verschobenen Positionen der Bindungspunkte (=Zusammentreffen von Kett- und Schussgarnen; Abbildung 5, B). Aus der Kombination aus Leinwand- und Körperbindung ergibt sich eine aufgebrochene Oberflächenstruktur des Gewebes mit erhabenen Fäden [Wallbaum et al.; 2006].



**Abbildung 5 Grundbindungsarten in Geweben**

**A:** Leinwandbindung. **B:** Körperbindung. Die Charakteristika für eine Leinwandbindung und eine Leinwand-/Körperbindung sind im Text beschrieben. [Wallbaum et al., 2006]

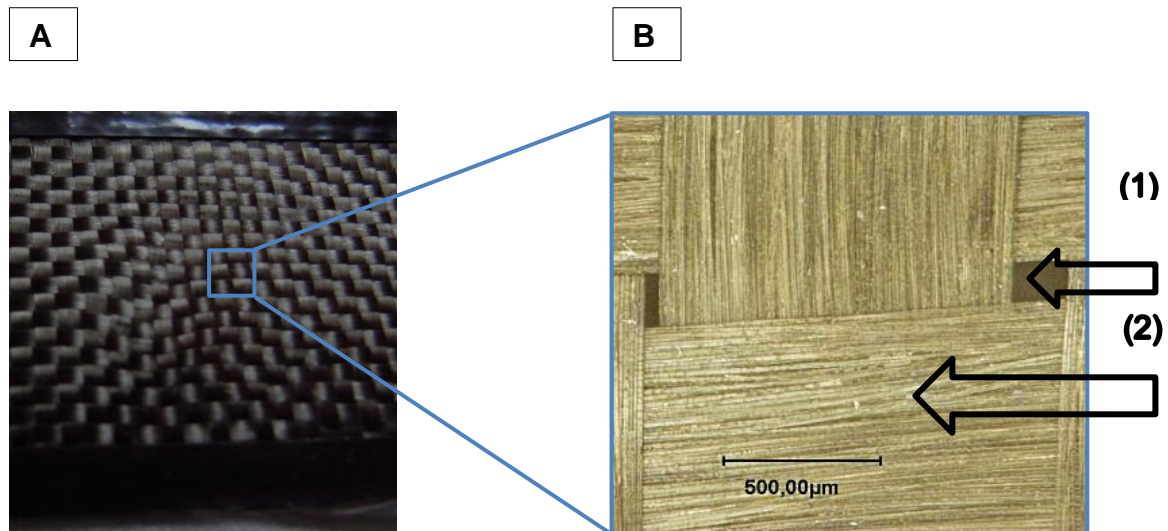
Abbildung 6 zeigt die Oberflächenstruktur des **PES-Gewebes** ohne Vergrößerung (A) und mit 100x Objektivvergrößerung (B). Aufgrund der Leinwandbindung ergeben sich Höhen und Tiefen in dem Gewebeprofil mit wenigen  $\mu\text{m}$  Höhendifferenz (Abbildung 6, A, (1)). In der Nahaufnahme sind die klar abgegrenzten Garnränder und die Zusammensetzung der Garne aus zahlreichen einzelnen Filamenten erkennbar (Abbildung 6, B, (2)). An der breitesten Stelle betrug der Durchmesser ca. 500  $\mu\text{m}$  und an der schmalsten ca. 250  $\mu\text{m}$ . Durchgeführte Rasterelektronenaufnahmen an dem Gewebe zeigten die glatte Oberfläche eines PES-Garns auf.



**Abbildung 6 Darstellung der Oberflächenstruktur des PES-Gewebes**

**A:** Gewebedarstellung ohne Vergrößerung. (1) Ersichtliche Höhendifferenz zwischen Oberkante der Kettfäden und Schussfäden **B:** Gewebedarstellung mit 100x Objektivvergrößerung. (2) klar abgegrenzte Garnränder und aus einzelnen Filamenten bestehende Garne

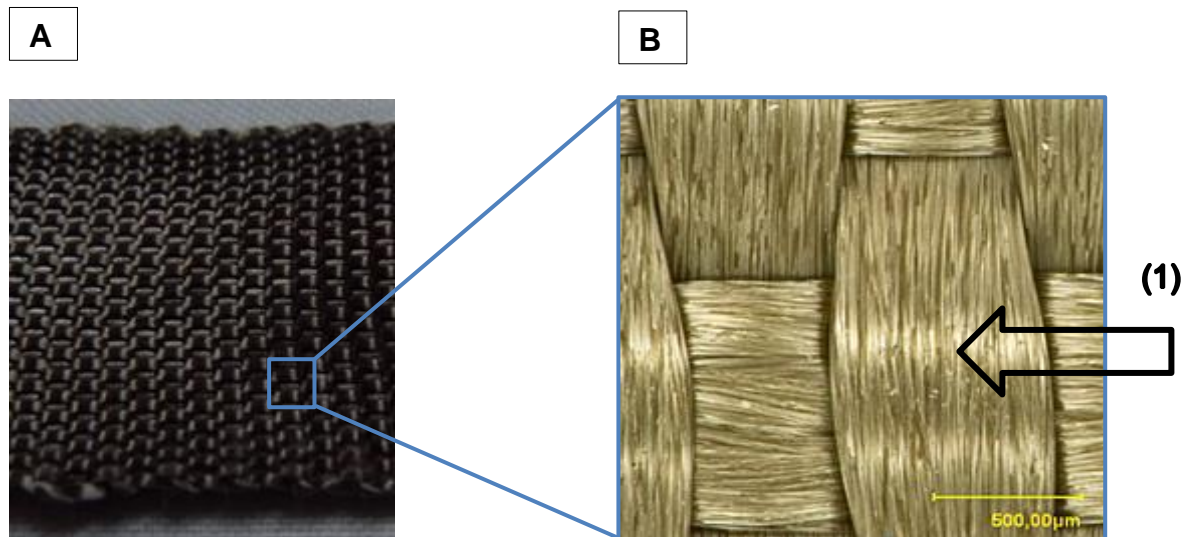
In der Abbildung 7 ist die Oberflächenstruktur des **Basaltleinwandgewebes 1** ohne Vergrößerung (A) und mit 100x Objektivvergrößerung (B) abgebildet. Das Bindungsmuster erscheint oberflächlich intakt. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, dass eine leichte mechanische Beanspruchung des Gewebes zu Verformung der Struktur mit Vergrößerung der Abstände der rechtwinklig angeordneten Garne (Abbildung 7, (1)) führt. In der rechten Abbildung ist die Zusammensetzung eines Garns aus einzelnen Filamenten gut erkennbar (Abbildung 7, (2)). Die Glattheit der Oberfläche einer Basaltgarne wurde in Rasterelektronenaufnahmen aufgezeigt. Das Garn besitzt einen ungefähren Durchmesser von 1,2 mm.



**Abbildung 7** Darstellung der Oberflächenstruktur des Basaltleinwandgewebes 1

**A:** Gewebedarstellung ohne Vergrößerung. **B:** Gewebedarstellung in 100x Objektivergrößerung. (1) teilweise relativ großer Abstand zwischen den rechtwinklig angeordneten Garnen (2) Garn, das aus einzelnen und parallel angeordneten Filamenten zusammengesetzt war

Die Abbildung 8 zeigt die Oberflächenstruktur des **Basaltgewebes 2** mit festem gewebten Geweberändern. Die Leinwandbindung ist ohne Vergrößerung (Abbildung 8, A) und mit 100x Objektivergrößerung des Gewebeausschnittes (Abbildung 8, B) erkennbar. Die aus einer Vielzahl von einzelnen und gerichteten Filamenten bestehenden Garne sind in der Abbildung 8 (1) dargestellt. Dieses Gewebe wies einen durchschnittlichen Garndurchmesser von 0,7 mm auf.

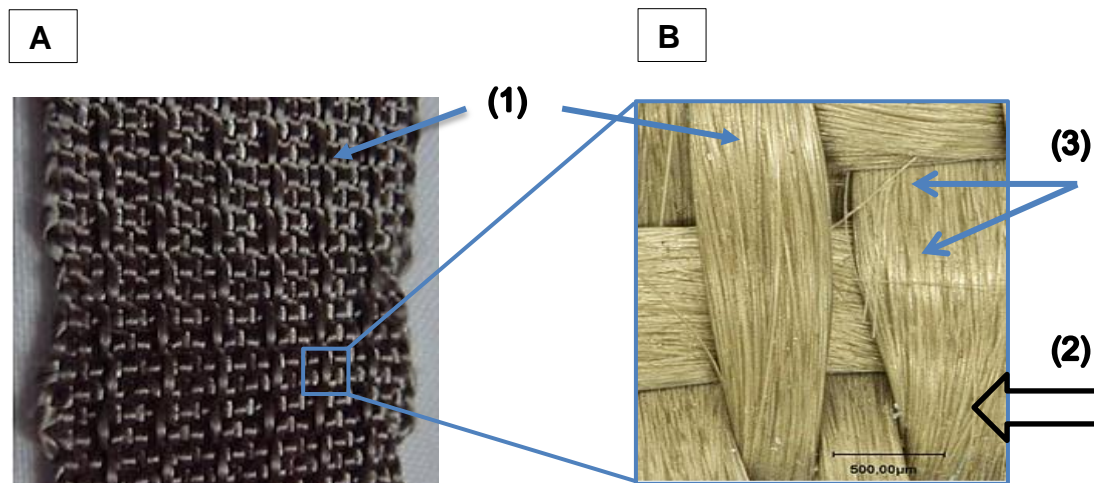


**Abbildung 8** Darstellung der Oberflächenstruktur des Basaltleinwandgewebes 2

**A:** Gewebedarstellung ohne Vergrößerung. **B:** Gewebedarstellung mit 100x Objektivvergrößerung. (1) einzelne und gerichtete Garnverläufe mit klar begrenzten Garnrändern

Das **Basaltgewebe 3** mit kombinierter Leinwand-Körperbindung und festen gewebten Geweberändern ist in Abbildung 9 dargestellt. Der Garnabstand zwischen jeweils den sechs in der Gewebebreite verarbeiteten Körperfäden (ein Faden wird als Garn zusammengefasst) beträgt ca. 2-3 mm (Abbildung 9, (1)). Die klar erkennbaren und in Einzelfilamenten vorliegenden Garne sind charakterisierend ((Abbildung 9, (2)). Auffällig bei diesem Gewebe waren die einzelnen, abstehenden und ungeordnet vorliegenden Faserenden.

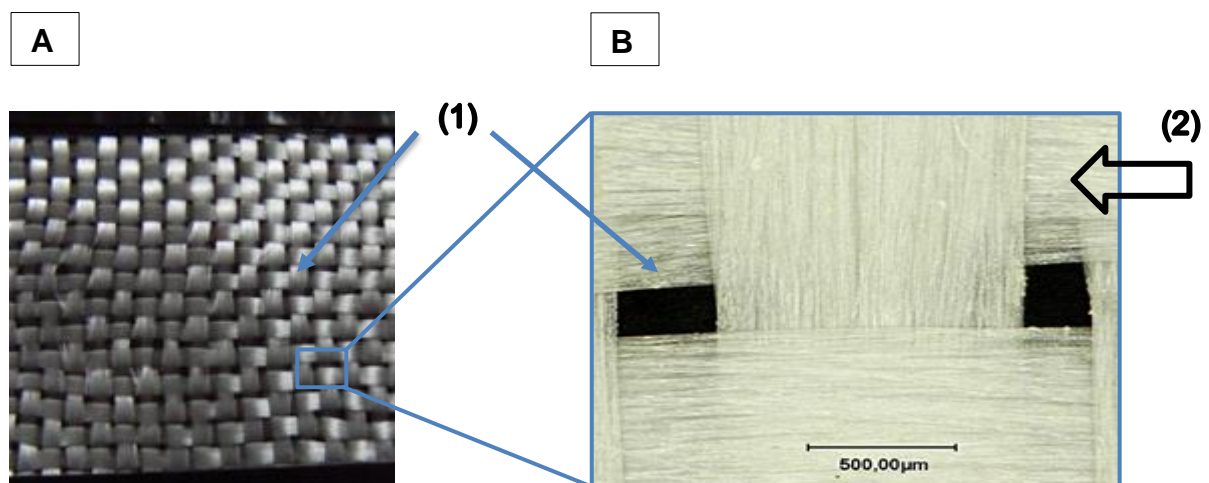




**Abbildung 9 Darstellung der Oberflächenstruktur des Basaltleinwandgewebes 3**

**A:** Gewebedarstellung ohne Vergrößerung. (1) erhöhter (< 1mm) Körperfaden **B:** Gewebedarstellung mit 100x Objektivvergrößerung. (2) aus einzelnen Filamenten bestehendes Garn (3) einzelne, aus der Gewebestruktur abstehende Faserenden

Die Oberflächenstruktur des **Glasgewebes** ist in der Abbildung 10 dargestellt. Die teilweise vergrößerten Abstände in der Gewebestruktur sind auf eine leichte mechanische Beanspruchung des Gewebes zurückzuführen (Abbildung 10, (1)). Ein Garn setzt sich aus zahlreichen einzelnen Filamenten zusammen (Abbildung 10, (2)). Aus Rasterelektronenaufnahmen wurde die glatte Garnoberfläche deutlich. Der Garndurchmesser wies einen Wert von ca.1mm auf.



**Abbildung 10 Darstellung der Oberflächenstruktur des Glasgewebes**

**A:** Gewebedarstellung ohne Vergrößerung. (1) Öffnung der Gewebestruktur **B:** Gewebedarstellung mit 100x Objektivvergrößerung. (2) ein aus zahlreichen Filamenten bestehendes Garn

Tabelle 2 fasst die relevanten textilen, physikalischen und chemischen Eigenschaften der Gewebe zusammen. Die Feinheit eines Garns ist definiert durch die Masse des Garns (g) bezogen auf einem Kilometer Garnlänge (Einheit: tex). Die flächenbezogene Masse eines Gewebes gibt die Masse einer Meter \* Meter großen Gewebestücke an (Einheit: g/m<sup>2</sup>) [Schmitt, 2004]. Eine Kontaktwinkelmessung für die Bestimmung der Oberflächenspannung der Gewebeoberflächen konnte aufgrund der Gewebeform der Aufwuchsträger nicht durchgeführt werden.

**Tabelle 2 Zusammenfassung der wichtigsten Eigenschaften der Gewebe**

Parameter/ Eigenschaften	Basaltgewebe	Glasgewebe	PES-Gewebe
Hydrophobizität	hydrophob	Hydrophob	hydrophob
Feinheit der Garne (tex)	(1) keine Angabe vom Hersteller (2) 272 (3) 272	keine Angabe vom Hersteller	220
Flächenbezogene Masse der Gewebe (g/m <sup>2</sup> )	(1) 272 (2) 730 (3) 730	260	700
Bindung	(1) Leinwand 1 (2) Leinwand 2 (3) kombinierte Leinwand-/Körperbindung	Leinwand	Leinwand
Polarität	positiv <sup>1</sup> [1]	positiv <sup>1</sup> [2]	negativ <sup>1</sup> [2]
„biologische Affinität“ der Gewebeoberfläche - Rauigkeit <sup>2</sup>	- (1) rauer als PES-Gewebe - (2) rauer als PES-Gewebe	- glatt	- rau
- Porosität (visueller Eindruck)	- ebene Oberflächenstruktur der Garne	- ebene Oberflächenstruktur der Garne	- ebene Oberflächenstruktur der Garne

**Quellen:**

[1] eigene Untersuchungen durchgeführt am STFI; (Messwerte im Anhang A1)

[2] eigene Untersuchungen durchgeführt am STFI; (Messwerte im Anhang A2)

## **2 Zielstellung**

Ziel dieser Abschlussarbeit ist die Beurteilung der Eignung verschiedener textiler Aufwuchsträger hergestellt auf Basis ausgewählter Naturfasern (Basalt-, Glasgewebe) und Chemiefasern (PES-Gewebe) hinsichtlich der Biofilmentwicklung. Dazu sollen Methoden für die Beurteilung der Aufwuchsträger einführend etabliert werden. Als Kriterien für die Bewertung werden eine Beschreibung der Biofilmentwicklung sowie die Bestimmung der Biofilmmassen und Zellzahlen von Biofilmausschnitten herangezogen.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

- Acridinorange (Carl-Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe)
- Natriumdithionit (Fisher Scientific, Schwerte)

#### 3.2 Medien

- Nährbouillon (Carl-Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe)

Zusammensetzung:                      Fleischextrakt              3,0 g/l  
    Pepton aus Gelatine 5,0 g/l  
    pH - Wert 7,0

- Trypton-Soja-Agar (Carl-Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe)

Zusammensetzung:                      Casein (tryptisch verdaut) 15,0 g/l  
    Sojapepton                      5,0 g/l  
    NaCl                              5,0 g/l  
    Agar                              15,0 g/l  
    pH - Wert 7,3

#### 3.3 Material

- Küvetten (Schichtdicke 1 cm, Hach – Lange Deutschland)
- Thoma-Zählkammer (Fläche 0,0025mm<sup>2</sup>, Tiefe 0,02mm, OptikLabor )

#### Probematerialien aus Leinwandgewebe

- Basaltgewebe (Firma Incotology GmbH, Pulheim)
- Glasgewebe (Firma R & G, Waldenbuch)

#### Probematerialien auf Bandwebmaschine gefertigt

- Basaltgarn (Firma Incotology GmbH, Pulheim)
- Polyestergarn PES High Performance Diolen®  
(Swicofil AG, Emmenbrücke (Schweiz))

### 3.4 Geräte

- Autoklav (Dampfsterilisator, LTA 300, ZIRBUS GmbH, Bad Grund)
- Bandwebmaschine (Saurer, Arborn (Schweiz))
- Digitalkamera CX3 (RICOH, Hannover)
- Exsikkator (Lenz Laborglas GmbH & Co. KG, Wertheim)
- Fluoreszenzmikroskop  
(ASKANIA–Labor fluoreszenz RATHENOW GmbH & Co.KG, Rathenow)
- Mikroskop mit digitaler Bildbearbeitung (Keyence VH- Z100R, Neu-Isenburg)
- Rasterelektronenmikroskop (Quanta FEG 250, FEI, Frankfurt a.M.)
- Ultraschallbad (Emag AG 60009, Salach)
- Trockenschrank (BINDER GmbH, Tuttlingen)
- WTW-Messgerät Multi 9430
  - pH- Elektrode                                Sen®Tix 940  
Digitale IDS pH- Elektrode
- Vortexer (IKA® MS 1 shakers, Sigma-Aldrich Hamburg)

## 4 Methoden

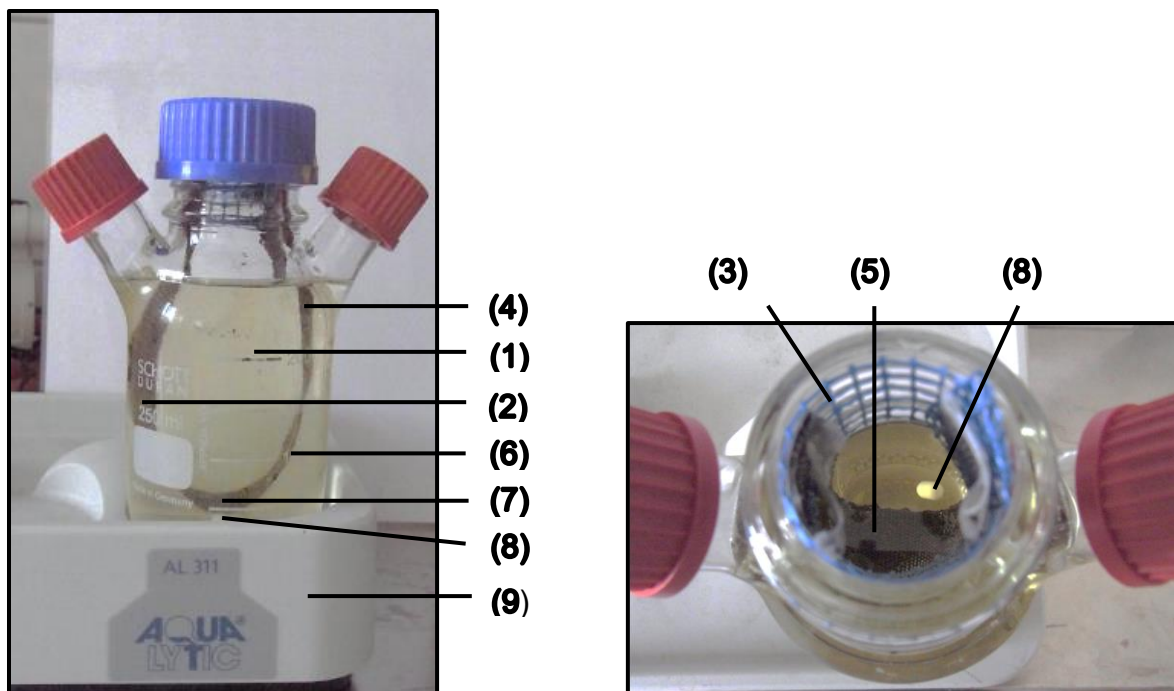
Für die Durchführung der Aufwuchsversuche auf den verschiedenen Geweben bzw. Aufwuchsmaterialien wurden die Berieselungswässer aus den Abluftreinigungsanlagen der Flammkaschierfirmen von CHM und Vow als Inokulum verwendet. Für die Untersuchung des Biofilmwachstums auf Basis der in den Berieselungswässern vorkommenden und kultivierbaren Mikroorganismen wurden die Kultivierungsbedingungen weitestgehend entsprechend der Umweltbedingungen in den Abluftreinigungsanlagen ausgewählt. Hierfür wurden mit einer digitalen IDS-pH-Elektrode der Firma WTW die pH-Werte der Berieselungswässer im Monat Mai/Juni 2014 bestimmt. Als Randbedingung der Aufwuchsversuche wurden die Zellzahlen der Inokula mit den in Kapitel 4.2 beschriebenen Methoden durchgeführt. Aufgrund von bisher nicht durchgeführten Untersuchungen zur mikrobiellen Zusammensetzung der Berieselungswässer ist sie als unbekannt anzunehmen. Im Rahmen dieser Arbeit war eine molekularbiologische Untersuchung aus zeitlichen und technischen Gründen nicht möglich.

### 4.1 Versuchsaufbau

Aus den Basalt- und PES- Garnen wurden mit Hilfe einer Bandwebmaschine der Firma Saurer Gewebebänder in den Abmessungen 20 mm \* 250 mm hergestellt. Aus technischen Gründen wurde das Glasfasergewebe aus einem fertigen Gewebe mit Klebestreifen auf die geforderte Gewebegröße präpariert. Dies war für die Gewährleistung der Gewebestabilität notwendig.

Zur Entfernung der Schlichte auf den Garnen erfolgte die Lagerung der Gewebe in einem warmen Seifenbad über 24 h. Für den Versuchsaufbau wurden 250 ml fassende Spinnerflaschen ausgewählt und jedes Kultivierungsgefäß mit jeweils 250 ml Nährbouillon befüllt. Als Inokulum wurden jeweils 5 ml eingesetzt. Anschließend wurden die Aufwuchsträger mit grobmaschigem Putzgittergewebe am Flaschenhals hängend in annähernd parabelartiger Position und ohne Glaswandkontakt angeordnet. Eine Kontaminationsgefahr der Nährlösung mit

Luftkeimen wurde durch das Verschließen der Flaschen verhindert, wobei ein Luftsauerstoffzutritt gewährleistet blieb. Die Lagerung der Glasflaschen erfolgte auf einer Magnetrührplatte mit im Tagesverlauf wechselnden rpm-Werten (exakte Werte sind unbekannt) und einem 0,9 cm kleinen Magnetstäbchen bei Raumtemperatur (ca.  $30 \pm 2$  °C) bei natürlichem Lichteinfluss ohne direkte Sonneneinstrahlung für 6 Wochen. Ein vollständiger Wechsel der Nährlösung (semikontinuierlicher Versuchsaufbau) wurde täglich und wöchentlich eine Säuberung der Glasränder vorgenommen. In der Abbildung 11 ist der Versuchsaufbau dargestellt.



**Abbildung 11 Gewebepositionierung in Kultivierungsgefäßen**

Parabelähnliche Gewebeaufhängung in 250 ml fassende Kultivierungsgefäße. Die Fixierung der Aufwuchsträger erfolgte mit einem grobmaschigen Putzgitter. (1) Nährbouillon (2) Gewebe (3) Putzgitter zur Gewebefixierung (4) Probeentnahmestelle (5) Gewebeinnenseite (6) Gewebeaußenseite (7) Scheitel (8) Magnetstäbchen (9) induktive Platte

Für die Dokumentation der Biofilmentwicklung im Versuchszeitraum von 6 Wochen wurden wöchentliche Fotoaufnahmen direkt nach dem Mediumswechsel mit einer Digitalkamera der Firma RICOH ausgeführt. Mikroskopische Untersuchungen am Ende der Versuchsdauer dienten der Beurteilung des Ausmaßes des Biofilmwachstums auf den Geweben.

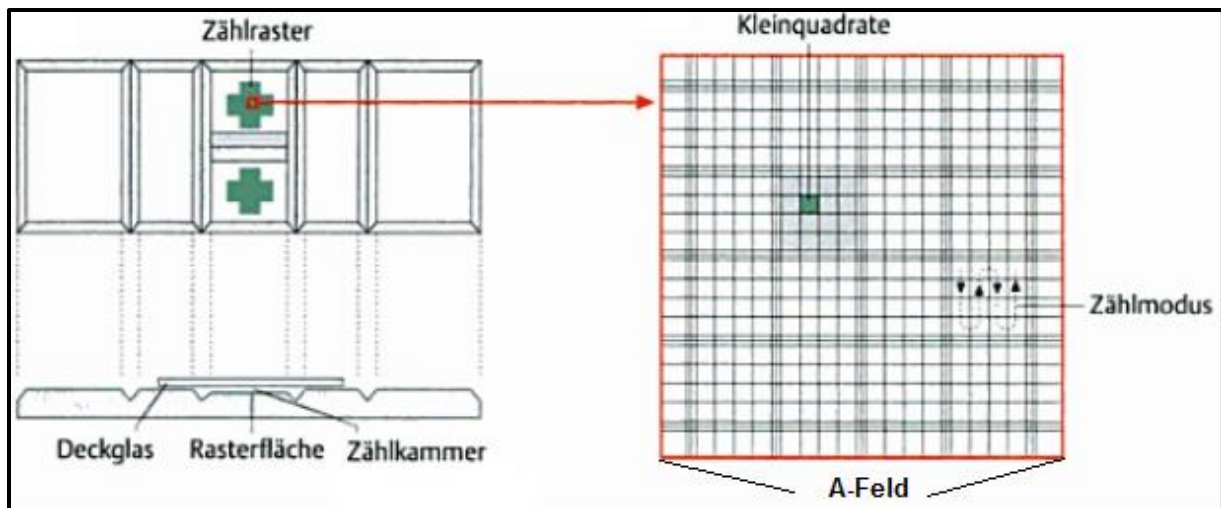
## 4.2 Bestimmung der Zellzahlen aus einem Biofilmausschnitt

Für die Wahl der Position des herauszutrennenden Gewebeabschnittes waren die annähernd identische Ausbildung des Biofilms auf allen Geweben und die Möglichkeit der beschädigungsfreien Entnahme entscheidend. Demzufolge wurden mit einer Schere im oberen Gewebedrittel (siehe Abbildung 11, (4)) ein Ausschnitt (Fläche sollte ca. 1 cm<sup>2</sup> betragen) herausgetrennt. Die Desorption der Zellen von der Materialoberfläche erfolgte mit 10 ml einer 0,9% igen Natriumchloridlösung. Der Sauerstoffgehalt dieser Lösung wurde entsprechend des Sauerstoffgehaltes der Nährbouillon mit Natriumthionit auf 0,1 mg/l abgesenkt. Nach anschließender kräftiger, einstündiger Schüttlung der Aufwuchsträger auf einer Schüttelplatte bei Raumtemperatur wurde nach Anlegen der Verdünnungsreihe die Gesamtzellzahl pro Milliliter lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer ((Abbildung 12) bestimmt. Die Zählkammer wird durch einen definierten Raum zwischen 2 parallel angeordnete Glasflächen (Deckglas und Objektträger) begrenzt und setzt sich aus 2 A-Feldern, die jeweils aus 16 B-Felder zusammengesetzt sind, zusammen. 16 C-Felder ergeben wiederum ein B-Feld (Abbildung 12). Mit Hilfe von Skalierungen auf dem Mittelsteg des Objektträgers und den Abstand zwischen Unterkante des Deckglases und dem Objektträger kann mit diesem definierten Kammervolumen nach der Formel

$$\text{Berechnung der Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} * \text{Kammertiefe(mm)} * \text{Verdünnung}}$$

die Zellzahl pro Milliliter bestimmt werden. Die verwendete Thoma- Zählkammer wies eine Tiefe von 0,02 mm auf und die Größe des C - Feldes betrug 0,0025 mm<sup>2</sup>. Die exakte Bestimmung der Ausgangsfläche der entnommenen Gewebeprobe konnte nach Abschluss der Methode ermittelt werden.





**Abbildung 12 Darstellung einer Thoma-Zählkammer und Skalierung eines A-Feldes einer Zählkammer**

Die verwendete Thoma - Zellkammer wies eine Tiefe von 0,02 mm auf. Die Größe des C-Feldes wurde mit 0,0025 mm<sup>2</sup> angegeben.

[Richter, 2003]

Bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl in der Thoma-Zählkammer ist darauf zu achten, dass die Zellen gleichmäßig in der Kammer verteilt sind und die Mikroorganismenanzahl gut auszählbar ist. Bei zu hohen Zellkonzentrationen sind entsprechende Verdünnungen auszuwählen. Die Differenz in der ausgezählten Anzahl sollte die Anzahl von 10 Zellen in den Groß- und Gruppenquadraten nicht übersteigen. Für die Durchführung der Doppelbestimmungen mit dem Ziel ein sicheres und eindeutiges Ergebnis zu erhalten, sollten beide A-Quadrate ausgezählt werden. Voraussetzungen für ein sicheres Ergebnis sind die richtige Platzierung des Deckglases, das luftblasenfreie Beschicken der Zellkammer, eine gesäuberte Kammer und die Beschickung der Kammer mit einem geeigneten Volumen [Richter, 2003].

Das Ausplattieren von 100 µl der Biofilmprobe-Natriumchloridlösung auf TS-Agar diente der Bestimmung der teilungsfähigen Zellen (KBE) unter den ausgewählten Kultivierungsbedingungen. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte bei Raumtemperatur (ca. 30 °C) und unter natürlichem Lichteinfluss ohne direkte Sonneneinstrahlung für 24 h.

### **4.3 Bestimmung der Gesamtbiomassen auf den Aufwuchsträgern**

Als Gesamtbiomasse wird die Gesamtheit der organischen und anorganischen Trockenmasse der Biofilme auf den Aufwuchsträgern bezeichnet. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass kein Gewichtsverlust der Gewebe bei dem Trockenvorgang eintritt. Die Gewebe wurden in einem Glasgefäß bei 105 °C über 5 h in einem Trockenschrank getrocknet. Nach dem anschließenden Abkühlen im Exsikkator erfolgte das Wiegen der mit getrocknetem Biofilm versehenen Gewebe. In einem nachfolgenden und beheizten Ultraschallbad (Leistung des Gerätes 200 W) über einen Zeitraum von sechs Minuten in einem mit destilliertem Wasser gefüllten Glasgefäß wurde der getrocknete Biofilm von den Geweben entfernt. Nach erneutem Trocknen der gesäuberten Aufwuchsträger im Trockenschrank und Abkühlen in einem Exsikkator konnte nach Abwiegen der Gewebe mit und ohne Biofilm die Trockenmasse an Biofilm auf den Geweben bestimmt werden.

### **4.4 Anfärbung von Zellen aus einem Biofilmausschnitt mit der Acridinorangefärbung**

Mit dem Hintergrund der unbekannten mikrobiellen Zusammensetzung der Berieselungswässer von CHM und Vow sollte die Fragestellung erörtert werden, ob eine morphologische Unterscheidung der Zellen aus den Biofilmausschnitten auf den Geweben möglich ist. Die Acridinorangefärbung ist hierfür eine geeignete Methode. Acridinorange ist ein basischer Fluoreszenzfarbstoff mit einer positiven Ladung. Der Farbstoff lagert sich an die negativ geladenen d.h. basophilen (sauren) Komponenten (beispielsweise der Zellwände) der Mikroorganismen an. Eine Differenzierung der Mikroorganismen hinsichtlich des morphologischen Aufbaus ist möglich. Der Farbstoff ist gekennzeichnet durch einen rot-grün Metachroismus. Er emittiert Licht zweier Wellenlängen in Abhängigkeit der eingesetzten Farbstoffkonzentration. Zunächst wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration 1mg / ml – entsprechend der Produktempfehlung- hergestellt. Die Arbeitskonzentration sollte ca. 5 µg/ml betragen. Auf Grundlage der metachroistischen Eigenschaft des Farbstoffes und der ausgewählten Konzentration des Farbstoffes ( $9 \cdot 10^{-9}$  M) emittiert dieser bei Anregung mit blauem Licht der Wellenlänge 490 nm

grünes Emissionslicht (Wellenlänge 530 nm). Als Entnahmeort des Gewebematerials wurde die bereits erwähnte Probeentnahmestelle (Abbildung 11, (4)) ausgewählt. Für die Gewinnung der Biofilmzellen wurde analog der Methode für die Bestimmung der Zellzahlen vorgegangen. Das Reaktionsgemisch wurde aus 200 µl der Acridinorange-Arbeitslösung und 2 ml der Probenlösung hergestellt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Biofilmproben erfolgte nach 3 min bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 490 nm. Zudem wurde bei der Durchführung der Versuche auf einen neutralen pH-Wert geachtet [Remde et al., 1998; Oltmanns, 1996; Alexander et al. 2006].

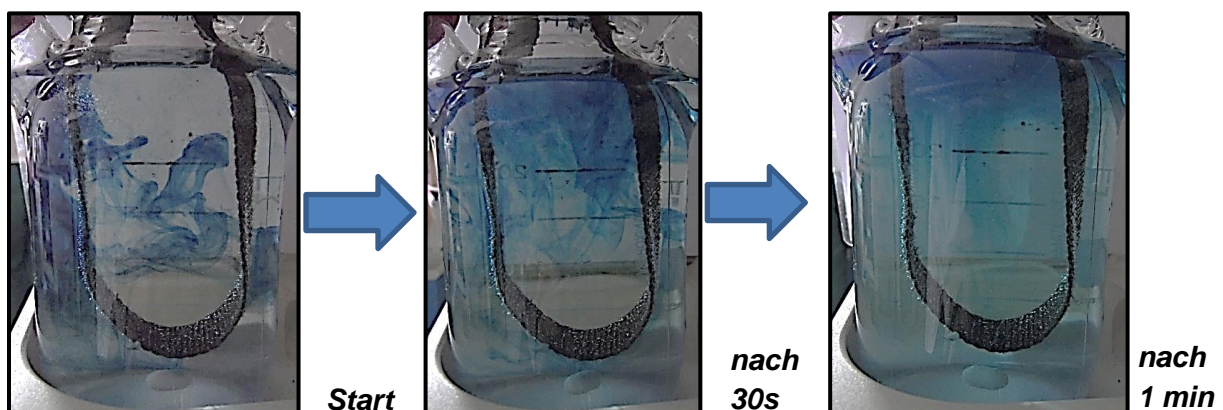
## 5 Ergebnisse

Die Bestimmung der pH-Werte mit einer digitalen IDS-pH-Elektrode der Firma WTW zeigte neutrale pH-Werte (CHM: Ø 7,6 (Monate Mai/Juni); Vow: Ø 7,0 (Monate Mai/Juni)) beider Berieselungswässer auf. Als weitere Randbedingungen der Versuchsdurchführung sollen die ermittelten Gesamtzellzahlen der Berieselungswässer in einer Thoma-Zählkammer von  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml (CHM) bzw.  $6 \cdot 10^5$  Zellen/ml (Vow) und die Lebendzellzahl  $4 \cdot 10^6$  KBE/ml (CHM) und  $1 \cdot 10^5$  KBE/ml (Vow) genannt werden.

### 5.1 Biofilmentwicklung auf den Aufwuchsträgern

#### 5.1.1 Einfluss der wirkenden Scherkräfte auf das Biofilmwachstum am Beispiel von Basaltgewebe

Die von einem 0,9 cm kleinen Magnetstäbchen ausgehenden Wasserströmungen sind in Abbildung 13 mit 250 µl Methylenblaufarbstoff visualisiert. Innerhalb von ca. 30 s war eine Verteilung des Farbstoffes mit Konzentration an der Flüssigkeitsoberfläche und nach einer Minute die vollständige Farbstoffverteilung zu erkennen (Abbildung 13, rechtes Bild).



**Abbildung 13 Darstellung der Farbstoffverteilung innerhalb von einer Minute**

Die Abbildung stellt die Verteilung des Farbstoffes innerhalb von einer Minute nach Beginn des Pipettierens am Bodengrund dar. In dem rechten Bild ist die Farbstoffkonzentration an der Flüssigkeitsoberfläche zu sehen.

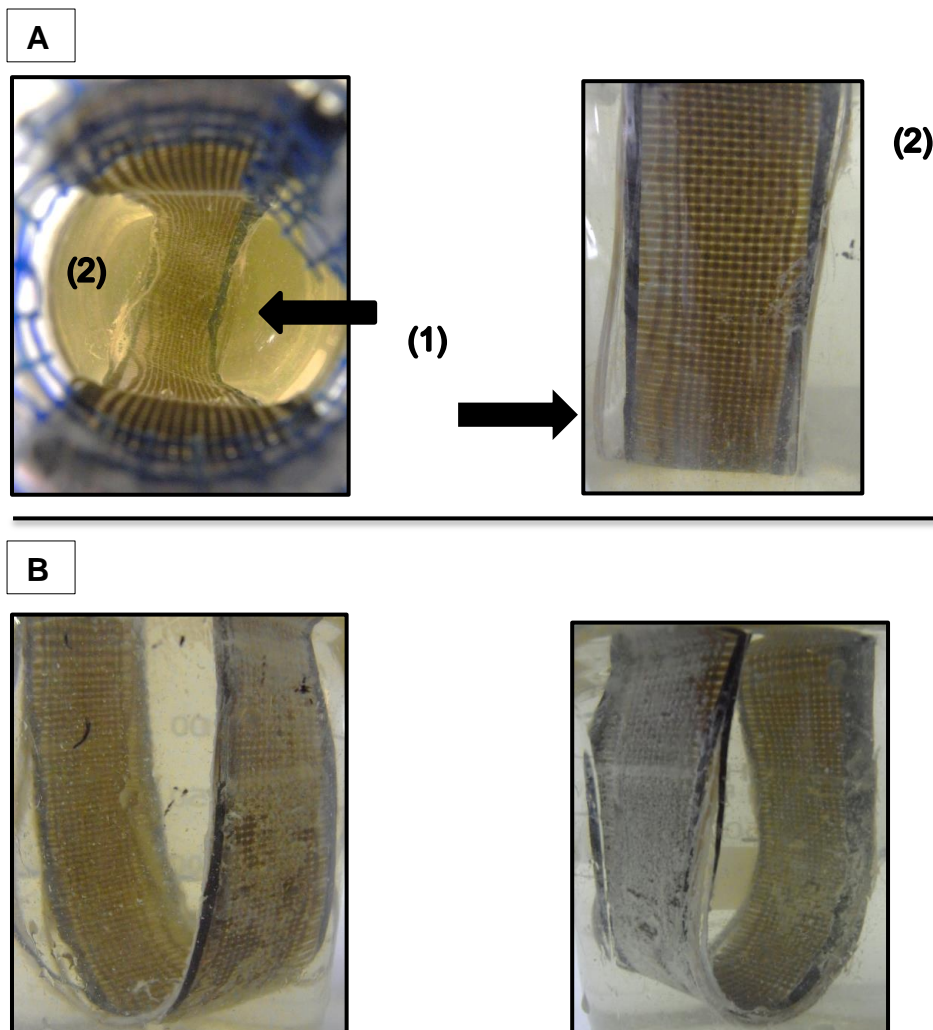
Der Versuchsaufbau mit dem mit Hilfe von Klebestreifen stabilisierten Basaltgeweben zeigte sowohl bei dem Versuchsansatz mit dem Berieselungswasser von CHM und von Vow bereits nach einer Woche eine teilweise Ablösung des Klebestreifens im Scheitelpunkt des Gewebematerials. In Folge dessen löste sich die Gewebestruktur mit Verlust der Bindungsform von der Randseite beginnend auf. Als Ursache wurden die von dem Rührfisch ausgehenden und wirkenden Scherkräfte auf das Gewebe angenommen. Die in Abbildung 13 visualisierte Farbstoffverteilung in der Glasflasche ausgehend von dem Magnetstäbchen verursachte Wasserströmung kann die Annahme der Wirkung von Scherkräften auf die Gewebe unterstützen.

Die Entwicklung oder Ausprägung des Biofilms veränderte sich in entsprechend der Veränderung der Gewebestruktur und der Gewebeeigenschaften. So wurde die Biofilmentwicklung maßgebend durch die Verlagerung von Garnen in dem Gewebe und in bzw. aus der Ebene ragende Gewebeteile beeinflusst. Ein (unkontrollierbarer) Verlust und Hinzufügen von Materialoberflächen in Folge des Abspreizens und des Ablösens von Filamenten könnte möglicherweise ebenfalls eintreten.

Nach einer Woche Versuchsdauer (Abbildung 14, A) zeigte sich bereits ein Ablösen des Klebestreifens im Bereich des Scheitelpunktes. In Folge dessen lösten sich die dem Klebestreifen am nächsten liegenden Kett- bzw. Schussgarne aus dem Gewebeverband und einzelne Garne ragten in die Flüssigkeit (Abbildung 14, (1)). An den Geweberändern war die Biofilmbildung makroskopisch deutlich zu sehen (Abbildung 14, (2)). An den übrigen Gewebeflächen war an der Außen- und Innenseite ein gering ausgeprägter Biofilm in Form von einzelnen Mikrokolonien erkennbar. Eine bevorzugte Position des Biofilms konnte nicht beobachtet werden.

Nach drei Wochen Versuchsdauer (Abbildung 14, B) hatten sich die Klebestreifen an dem Scheitelpunkt vollständig abgelöst und schwammen in der Flüssigkeit. Randnahe Filamente lösten sich aus dem Gewebe. Diese wurden gleichmäßig von Biofilmwachstum umzogen. In der Vorderansicht betrachtet war eine Verschiebung des Gewebes aus der zentralen Achse sowie eine Positionsänderung der Gewebeflächen in bzw. aus der Ebene erkennbar. In Folge dessen war der Einfluss der Strömung auf einer Gewebeaußenseite höher. Dort konnte eine deutlich geringere und ungleichmäßigere Bedeckung besonders in dem unteren Drittel der Oberfläche

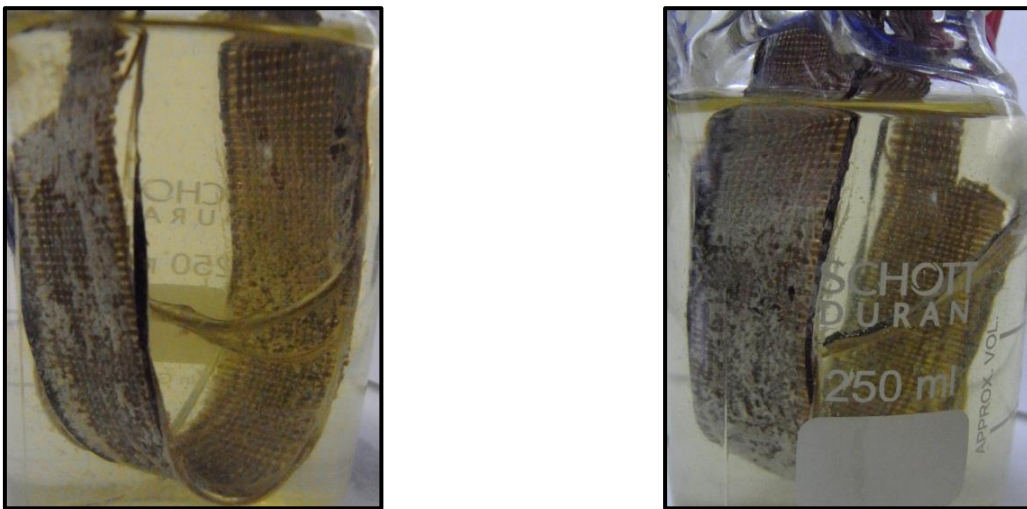
mit Biofilm beobachtet werden (Abbildung 14, B, rechtes Gewebeteil). Die gegenüberliegende Seitenaußenfläche wies einen gleichmäßigeren und stärkeren Biofilm auf (Abbildung 14, B, linkes Gewebeteil). Das Biofilmausmaß und die Biofilmdicke der Innenseite waren generell geringer als auf der Außenseite und unterlagen ebenfalls dem Strömungseinfluss. Die Seitenaußenfläche mit dem stärkeren Biofilm wies auf der Innenseite einen Biofilm mit geringerer Dicke und in unregelmäßiger Ausprägung auf. Diese Gegebenheit war für die gegenüberliegende Seite mit umgekehrter Ergebnisdarstellung ebenso gültig.



**Abbildung 14 Darstellung der wirkenden Scherkräfte am Beispiel des mit Klebestreifen versehenen Basaltgewebes 1 (Vow)**

**A:** Biofilmwachstum auf dem Gewebe nach einer Woche Versuchsduer. **B:** Biofilmwachstum auf dem Gewebe nach drei Wochen Versuchsduer. (1) am Rand liegende Kett- bzw. Schussgarne ragten in die Flüssigkeit (2) deutliche Biofilmbildungen an den Geweberändern. Mit der Gewebeverschiebung aus der zentralen Achse veränderte sich das Biofilmwachstum auf dem Gewebe.

Abbildung 15 stellt das Biofilmwachstum in der Vorder-/Seitenansicht auf der Basaltprobe mit Klebestreifen abgeklebten Geweberändern am Versuchsende dar. Insgesamt nahmen das Biofilmausmaß und die Biofilmdicke auf dem Gewebe zu. Auf einer Gewebeseite zeigte eine randnahe Fläche (ca. 1,5 cm vom Rand) besonders in Scheitelnähe im Vergleich zu der anderen Seite einen deutlicheren Biofilm (Abbildung 15, linke Seite). Auf beiden Seitenflächen war auf dem Gewebeabschnitt direkt unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche eine gleichmäßigere Biofilmentwicklung erkennbar. Die Einflüsse der Flüssigkeitsströmung und das in der Folge entsprechende Biofilmwachstum wurden am Versuchsende deutlich erkennbar.



**Abbildung 15 Darstellung der wirkenden Scherkräfte am Beispiel des mit Klebestreifen versehenen Basaltgewebes am Versuchsende (Vow)**

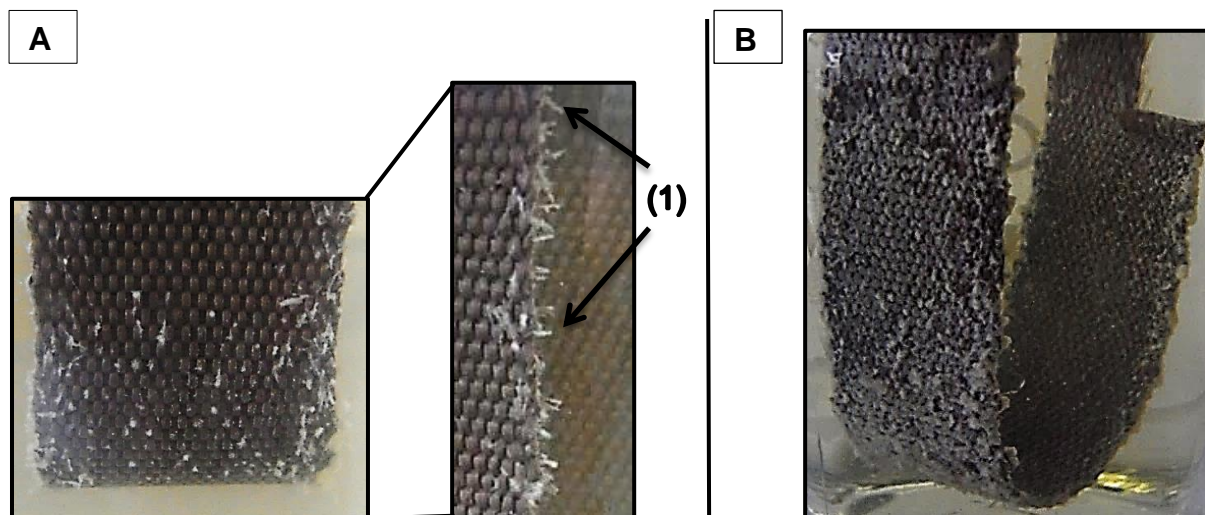
Unterschiedliche Biofilmbedeckung der beiden äußeren Gewebeseiten in Folge der einwirkenden Flüssigkeitsströmung auf das sich aus der senkrechten Ebene ragende Gewebebändchen.

### **5.1.2 Biofilmwachstum auf den Basalt-, Glas- und PES-Geweben im zeitlichen Verlauf**

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Biofilmentwicklung auf dem Basalt-, Glas- und PES-gewebe mit Leinwandbindung nach 6-wöchiger Versuchsdauer dargestellt. Als Inokulum wurden die Berieselungswässer von CHM und Vow eingesetzt und die Ergebnisse des Biofilmwachstums miteinander verglichen.



Nach einwöchiger Versuchsdauer konnten auf der **Basaltleinwandprobe (CHM)** einzelne Mikrokolonien am Geweberand, an der Gewebeseitenfläche und in Scheitelnähe beobachtet werden. Auffällig war das Biofilmwachstums auf den gebrochenen und mehrere Millimeter abstehenden Filamenten (Abbildung 16, (1)). In der zweiten Versuchswoche war eine beginnende Ausbreitung der Mikrokolonien über der Gewebeaußenseite in Richtung Gewebeaufhängung und eine Zunahme der Biofilmdicke zu beobachten. Die Mitten der Seitenflächen wurden im Vergleich zu den anderen Gewebeflächen geringer mit Biofilm besiedelt. Die Anzahl der Mikrokolonien auf der Innenseite des Gewebes war im Vergleich zur Außenseite deutlich geringer. Charakteristisch für das Biofilmwachstum ab der dritten Versuchswoche war die flächige Verteilung des Biofilms über das komplette Gewebe. Die Gewebestruktur mit der Anordnung des Bindungsmusters zeichnete sich deutlich ab. Am Ende der Versuchsdauer war eine 100%ige Bedeckung der Materialoberfläche noch nicht erreicht. Das geringste Biofilmwachstum zeigte sich an den Mitten der Seitenfläche. Die Spitze des Scheitels direkt oberhalb des Magnet-rührfisches wies das minimalste Biowachstum auf. Die Biofilmbedeckung (Verteilung über die Materialoberfläche) der Außen- und Innenseite war im Vergleich (ohne mikroskopische Untersuchungen) nahezu gleich.



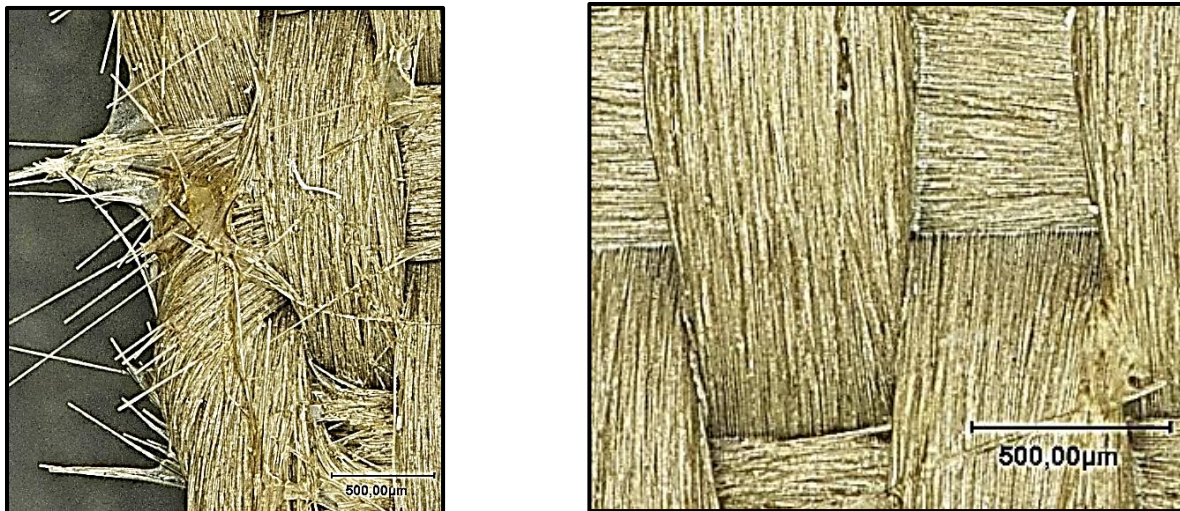
**Abbildung 16 Biofilmwachstum auf der Basaltleinwandprobe (CHM)**

**A:** Biofilmwachstum auf dem Gewebe in der ersten Versuchswoche. (1) Biofilmwachstum auf den abstehenden Filamenten **B:** Biofilmwachstum auf dem Gewebe am Versuchsende.

Im Unterschied zu der CHM-Probe zeigte sich bei der **Basaltleinwandprobe von Vow** bereits in den ersten beiden Versuchswochen der zeitliche Rückstand der



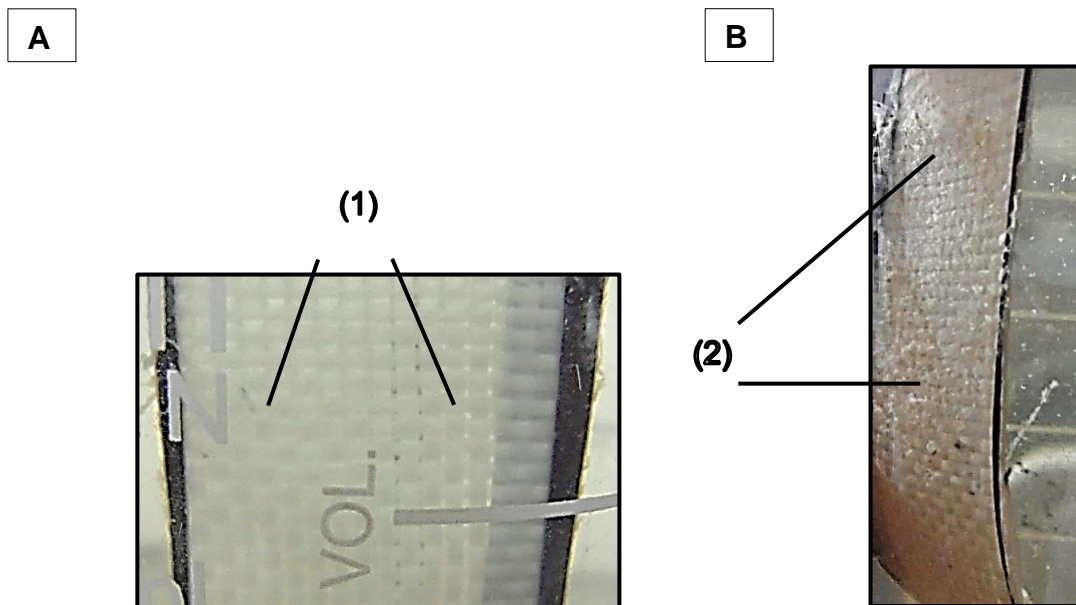
Biofilmentwicklung. Am Versuchsende wiesen beide Proben eine nahezu 100% Biofilmbedeckung (Ausnahme Scheitel) mit makroskopisch betrachtet geringerer Biofilmdicke und einzelnen fadenartige Mikrokolonien über das Gewebe verteilt auf. Mit einem Mikroskop der Firma Keyence bei 100x Objektivvergrößerung konnte auf beiden Basaltleinwandgeweben ein Biofilm verteilt über das komplette Gewebe beobachtet werden. Ein verstärkter Biofilm zeichnete sich an den Geweberändern und an den Garnrändern ab. In der Abbildung 17 ist stellvertretend die CHM-Probe dargestellt.



**Abbildung 17 Mikroskopische Aufnahme des Basaltgewebes bei 100x Objektivvergrößerung (CHM)**

Getrockneter Biofilm über den kompletten Gewebeabschnitt.

Bei Betrachtung des **Glasgewebes von CHM** konnten in der ersten Versuchswoche Mikrokolonien auf den Kleberändern, an den Seitenkanten der Klebestreifen und flächig über das Gewebe beobachtet werden. Im Scheitelbereich des Gewebes war der Biofilm als hauchdünne Schicht erkennbar. Die Zwischenräume zwischen den Garnen waren teilweise durch den Biofilm geschlossen (Abbildung 18, (1)). In der zweiten Versuchswoche zeigte sich insgesamt eine deutliche Biofilmmzunahme. Am Geweberand waren sich teilweise ablösende lokale Mikrokolonien an den Klebestreifen und aus dem Gewebe herauslösenden Filamenten erkennbar. Die Innen- und Außenseite waren gekennzeichnet durch einen geschlossenen und gewebestrukturabzeichnenden Biofilm mit unterschiedlichem Biofilmdicken (Plaques, (Abbildung 18, (2))). Die Biofilmbedeckung zeigte aus makroskopischer Sicht auf der Innen- und Außenfläche keinen erkennbaren Unterschied.

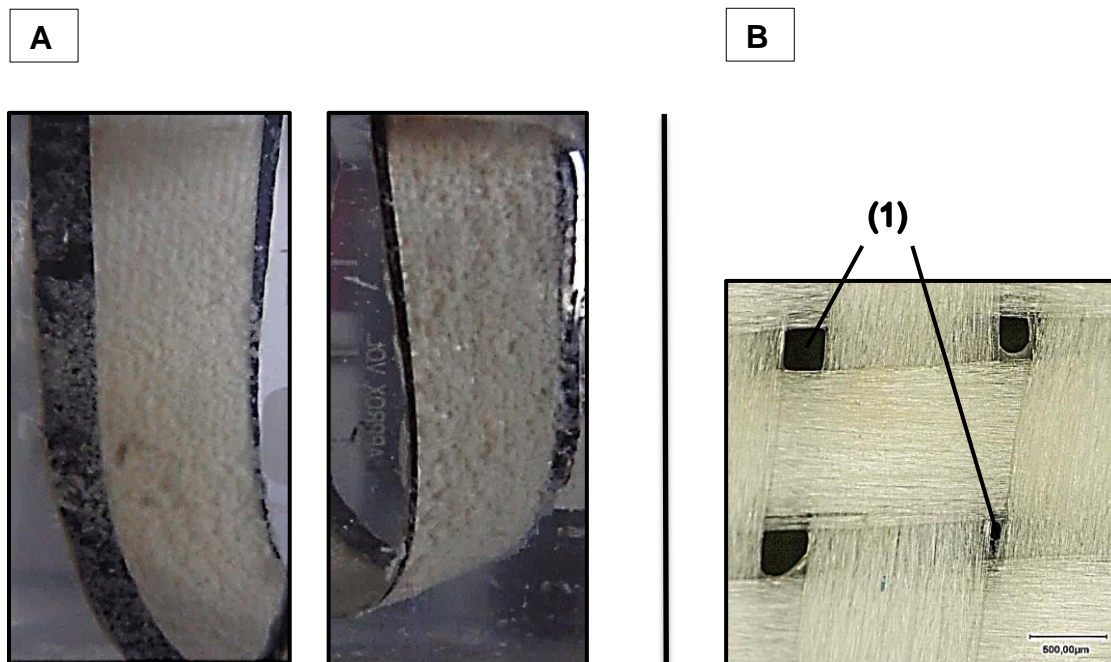


**Abbildung 18 Biofilmwachstum auf dem Glasgewebe (CHM)**

**A:** Biofilmwachstum auf dem Gewebe in der ersten Versuchswoche. (1) teilweise sind die Abstände zwischen den Garnen geschlossen **B:** Biofilmwachstum auf dem Gewebe in der zweiten Versuchswoche. (2) komplett über das Gewebe gewachsene Biofilme mit unterschiedlicher Dickenausprägung des Biofilms

Bei der Auswertung der dritten bis sechsten Versuchswoche war eine komplette Zunahme der Biofilmdicke erkennbar. Die Zwischenräume wurden gegen Versuchsende auf der kompletten Gewebefläche geschlossen (Abbildung 19, B). Eine 100%ige Biofilmdeckung mit auffälliger Ausbildung verschiedener Biofilmdicken konnte am Versuchsende erreicht werden. Mit der Verschiebung des Gewebes aus der Ebene verlagerte sich der Einfluss des Magnetstäbchens und eine Seitenfläche zeigte eine geringere Biofilmdicke im Vergleich zu der anderen Seite. Unterschiedliche Biofilmdicken zeichnete sich über das komplette Gewebe ab. Im Gegensatz zur Außenseite konnte auf der Innenseite des Gewebes eine regelmäßige Struktur beobachtet werden.

Untersuchungen der Glasgewebe mit einem Mikroskop bei 100x Objektivergrößerung zeigten komplett über den Gewebeausschnitt aufgewachsene Biofilme. Bei Betrachtung der randnahen Gebiete waren die komplett verschlossenen Poren der Bindungspunkte kennzeichnend. In der Gewebemitte waren diese bei beiden Geweben noch offen (Abbildung 19, (1)).



**Abbildung 19 Biofilmentwicklung auf dem Glasgewebe (CHM)**

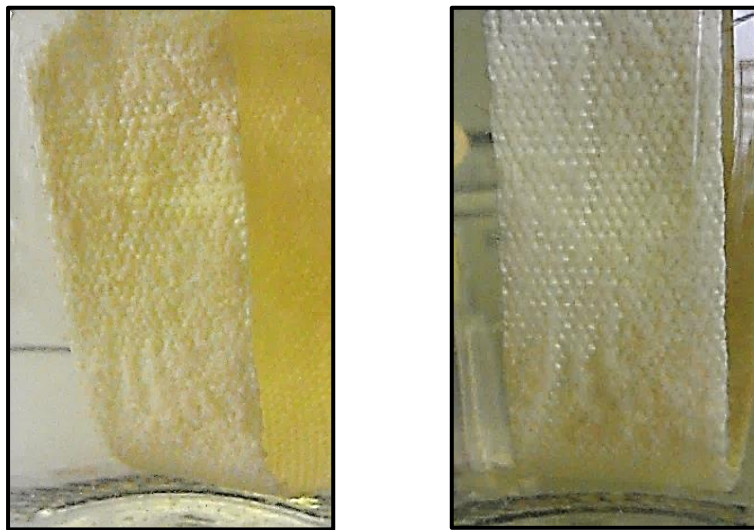
**A:** Biofilmentwicklung am Versuchsende. **B:** mikroskopische Aufnahme eines Gewebesausschnittes am Versuchsende mit 100x Objektivvergrößerung. (1) stellt die noch offenen Poren der Bindungspunkten dar

Das **Glasgewebe (Vow)** zeigte im Vergleich zu der Gewebeprobe (CHM) einen nahezu identischen Biofilmverlauf mit einem ca. 14-tägigen zeitlichen Rückstand. Am Versuchsende wies das Gewebe eine geringere Ausprägung der Biofilmdicke im Vergleich zu dem CHM- Gewebe bei 100% iger Oberflächenbedeckung auf.

Auf dem **PES-Gewebe (CHM)** konnte in den ersten beiden Versuchswochen makroskopisch nur eine minimale Biofilmanlagerung (Plaque) am Geweberand und vereinzelt auf der Innen- und Außenseite des Gewebes beobachtet werden. In Scheitelnähe wurden einzelne Mikrokolonien erkennbar. In diesem Bereich war die Biofilmdicke im Vergleich zum Geweberest am stärksten ausgeprägt. Die Innenseite wies an dem Scheitel vergleichend zu den restlichen Gewebeflächen einen kräftigeren Biofilm auf.

In der dritten bis zur sechsten Versuchswoche zeichnete sich über das komplette Gewebe mit Ausnahme des Scheitelpunkts eine flächige Biofilmentwicklung ab. Die

Innenfläche wies im Vergleich zu der Außenseite ein stärkeres Biofilmwachstum auf. Eine Ausbildung des Biofilms mit verschiedenen Biofilmdicken konnte makroskopisch betrachtet beobachtet werden. In der Mitte der Außenseite des Gewebes war der Biofilm am geringsten ausgeprägt. Eine minimale Gewebeflächenverschiebung in der Ebene führte auf einer randnahen Gewebefläche im Vergleich zu den gegenüberliegenden Flächen zu einem stärkeren Biofilm. Eine 100%ige Oberflächenbedeckung des Gewebes mit Biofilm konnte erreicht werden.



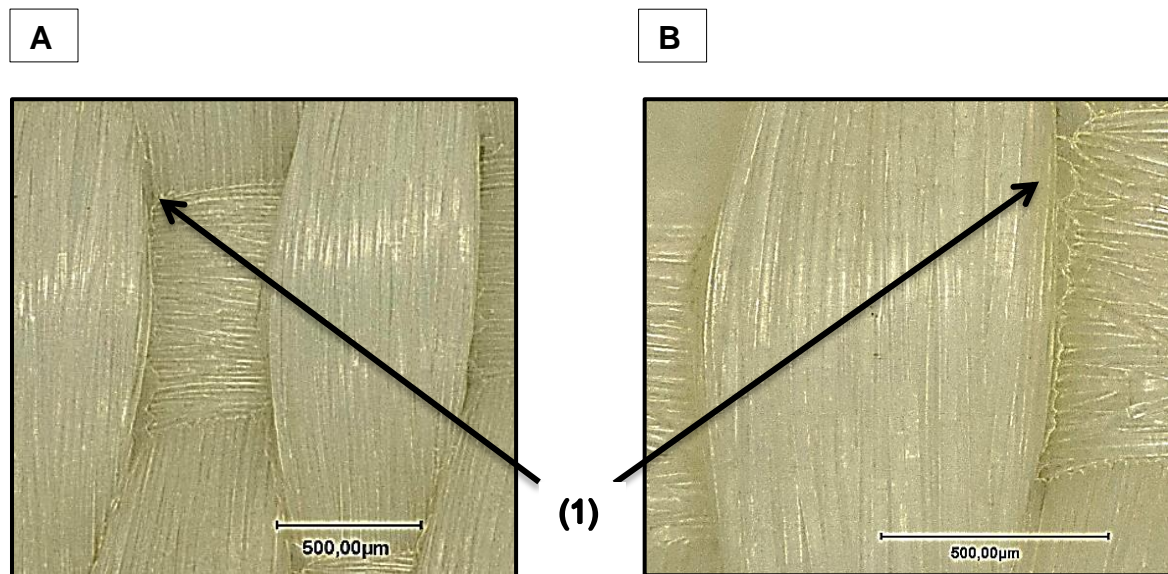
**Abbildung 20 Biofilmwachstum auf dem PES-Gewebe (CHM)**

Eine deutliche Biofilmentwicklung mit unterschiedlichen Biofilmdicken war über das gesamte Gewebe erkennbar. Der Scheitel war biofilmfrei.

Bei dem **PES-Gewebe von Vow** konnte der bisher bei den Basalt- und Glasgewebe beobachtete zeitliche Rückstand der Biofilmentwicklung nicht in der Deutlichkeit nachgewiesen werden. Die Biofilmentwicklung erfolgte nahezu identisch zu der CHM-Probe.

Die Betrachtung der PES-Gewebe mit 100x Objektivvergrößerung bestätigte die Ergebnisse der Basalt- und Glasgewebe. An den Geweberändern und den Garnrändern bzw. den Vertiefungen im Gewebe konnte der Biofilm (Abbildung 21, (1)) eindeutig nachgewiesen werden.





**Abbildung 21 Ausschnitt aus dem PES- Gewebe (CHM)**

**A:** Gewebedarstellung bei 100x Objektivvergrößerung. **B:** Gewebedarstellung bei 200x Objektivvergrößerung. (1) Der getrocknete Biofilm auf dem Gewebe zeichnete sich am deutlichsten an den Garnrändern bzw. den Gewebevertiefungen an.

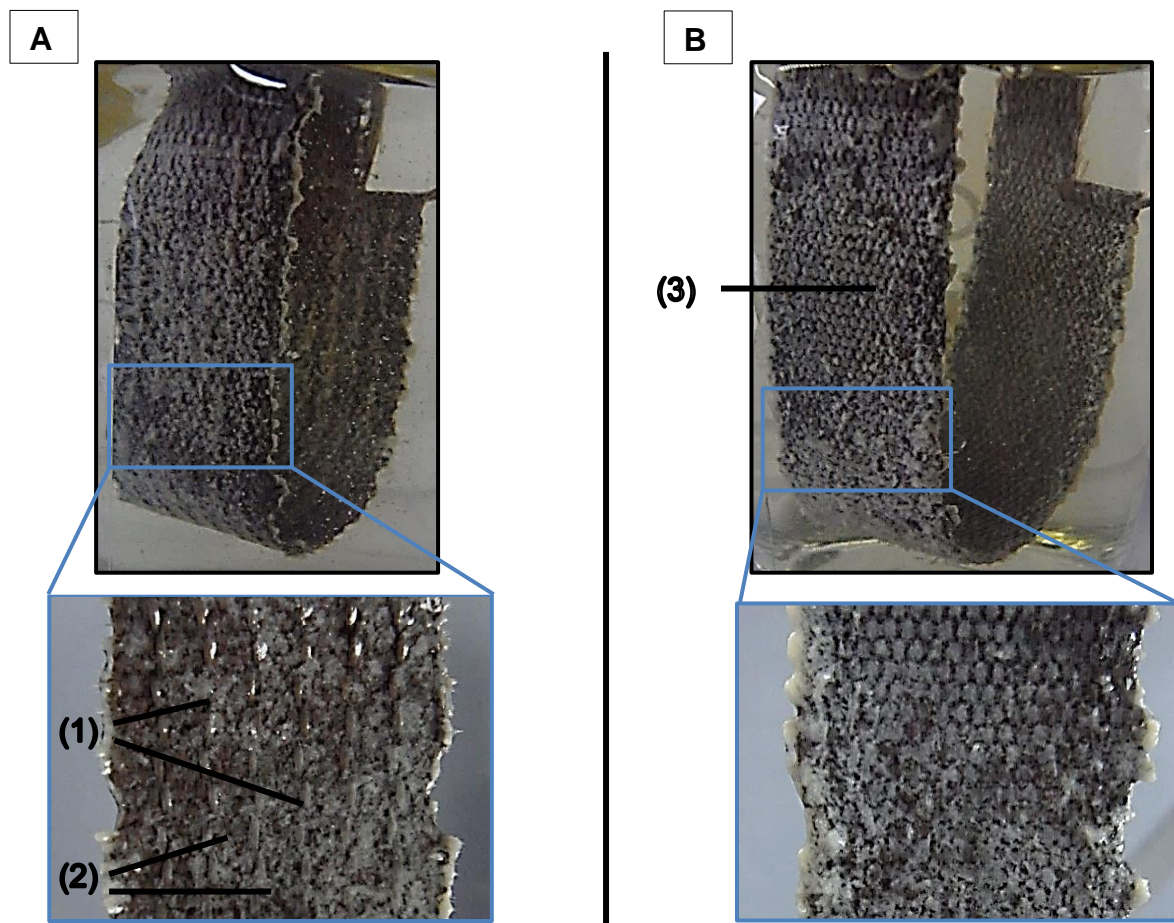
### 5.1.3 Einfluss der Struktur des Gewebes auf das Biofilmwachstum

Der Einfluss der Oberflächenstruktur des Aufwuchsträgers auf die Biofilmentwicklung kann an dem Basaltgewebe in der Ausführung mit einer Leinwandbindung und mit der Bindungsart Leinwand- und Körperbindung als Kombination aufgezeigt werden.

Als Gemeinsamkeiten der beiden Basaltproben sind das am Geweberand beginnende und am Scheitelpunkt verstärkt auftretende Biofilmwachstum zu nennen.

Der Köperfaden in der kombinierten Leinwand-/Körperbindung führte zu einer aufgebrochenen Oberflächenstruktur der Gewebe. Im Vergleich zu dem Leinwandgewebe erfolgte das flächige Biofilmwachstum auf den Basaltproben mit strukturierter Oberfläche mit zeitlicher Verzögerung von ca. einer Woche. Ein weiterer Unterschied lässt sich in dem Besiedelungsort der Mikrokolonien in der zweiten Phase der Biofilmentwicklung darstellen. Das Biofilmwachstum mit Ausbildung von Mikrokolonien auf den strukturierten Basaltproben war in den ersten Versuchswochen bevorzugt in der Nähe der Köperfäden erkennbar. Im Vergleich zu den Geweben mit Leinwandbindung war das Biofilmwachstum flächig ohne bevorzugte Position. Bis zu dem Versuchsende nahm das Biofilmwachstum bei beiden Basaltproben sowohl bei

CHM als auch bei Vow zu. Mit Zunahme des Biofilmwachstums konnte der Einfluss der hydrodynamischen Effekte besonders an den dünnen Biofilmdicken direkt auf den Körperfäden (Abbildung 22, (1)) beobachtet werden. Einem offenbar geringerem Einfluss der wirkenden Scherkräfte unterlagen die Zwischenräume der Körperfäden (Abbildung 22, (2)). Das Biofilmwachstum auf der Leinwandbindung war gekennzeichnet durch eine gleichmäßige, flächige Ausbildung des Biofilms (Abbildung 22, (3)). Die zeitliche verzögerte Biofilmentwicklung von ca. 14 Tagen, die bei den Basaltleinwand- und Glasgewebe festgestellt wurde, konnte bei diesem Aufwuchsversuch bestätigt werden.



**Abbildung 22** Gegenüberstellung der Basaltgewebe mit Leinwandbindung und kombinierter Leinwand-Körperbindung einer Vow-Probe am Versuchsende

**A:** Basaltgewebe mit kombinierter Leinwand-Körperbindung. **B:** Basaltgewebe mit Leinwandbindung. Der Einfluss der Scherkräfte zeigte sich besonders an den geringem Biofilmwachstum direkt auf den Körperfäden (1) und zwischen den Körperfäden (2). Die Basaltproben mit der Leinwandbindung wiesen ein gleichmäßiges, flächiges Biofilmwachstum auf (3).

## 5.2 Untersuchungen auf Zellebene

### 5.2.1 Zellzahlbestimmung aus Biofilmausschnitten

Die Ergebnisse der ermittelten Zellzahlen pro  $\text{cm}^2$  Gewebe nach Zählung in der Thoma-Zählkammer und Zählung der KBE auf den Agarplatten nach 24 h Inkubationszeit sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Als Stichprobenanzahl (n) wurde pro Zählung für jedes Gewebe die Anzahl vier gewählt. Die Basaltleinwandproben 1 mit den abgeklebten Geweberändern konnte aufgrund des Verlustes der Gewebestruktur nicht ausgewertet werden.

**Tabelle 3 Zellzahlbestimmung der Biofilmausschnitte von CHM und Vow**

Material	Gesamtzellzahl / $\text{cm}^2$ Gewebe	Teilungsfähige Zellen / $\text{cm}^2$ Gewebe
<b>Hinweis</b>	<b>CHM als Inokulum</b>	<b>CHM als Inokulum</b>
Basaltgewebe 2 mit Leinwandbindung	$1 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$
Basaltgewebe 3 mit Leinwand/ Körperbindung	$1 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^7$
Glasgewebe <u>Hinweis:</u> vollständige Gewebeauflösung während der Methodendurchführung	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^6$
PES-Gewebe	$8 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$
<b>Hinweis</b>	<b>Vow als Inokulum</b>	<b>Vow als Inokulum</b>
Basaltgewebe 2 mit Leinwandbindung	$3 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$
Basaltgewebe 3 mit Leinwand/ Körperbindung	$5 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^7$
Glasgewebe	$2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$
PES-Gewebe	$9 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$

Mit dem Ausplattieren der 0,9 % igen Natriumchloridlösung auf dem TS-Agar konnte kein Wachstum von Mikroorganismen nachgewiesen werden, d.h. es befanden sich keine kultivierbaren und nachweisbaren Mikroorganismen in der Lösung.

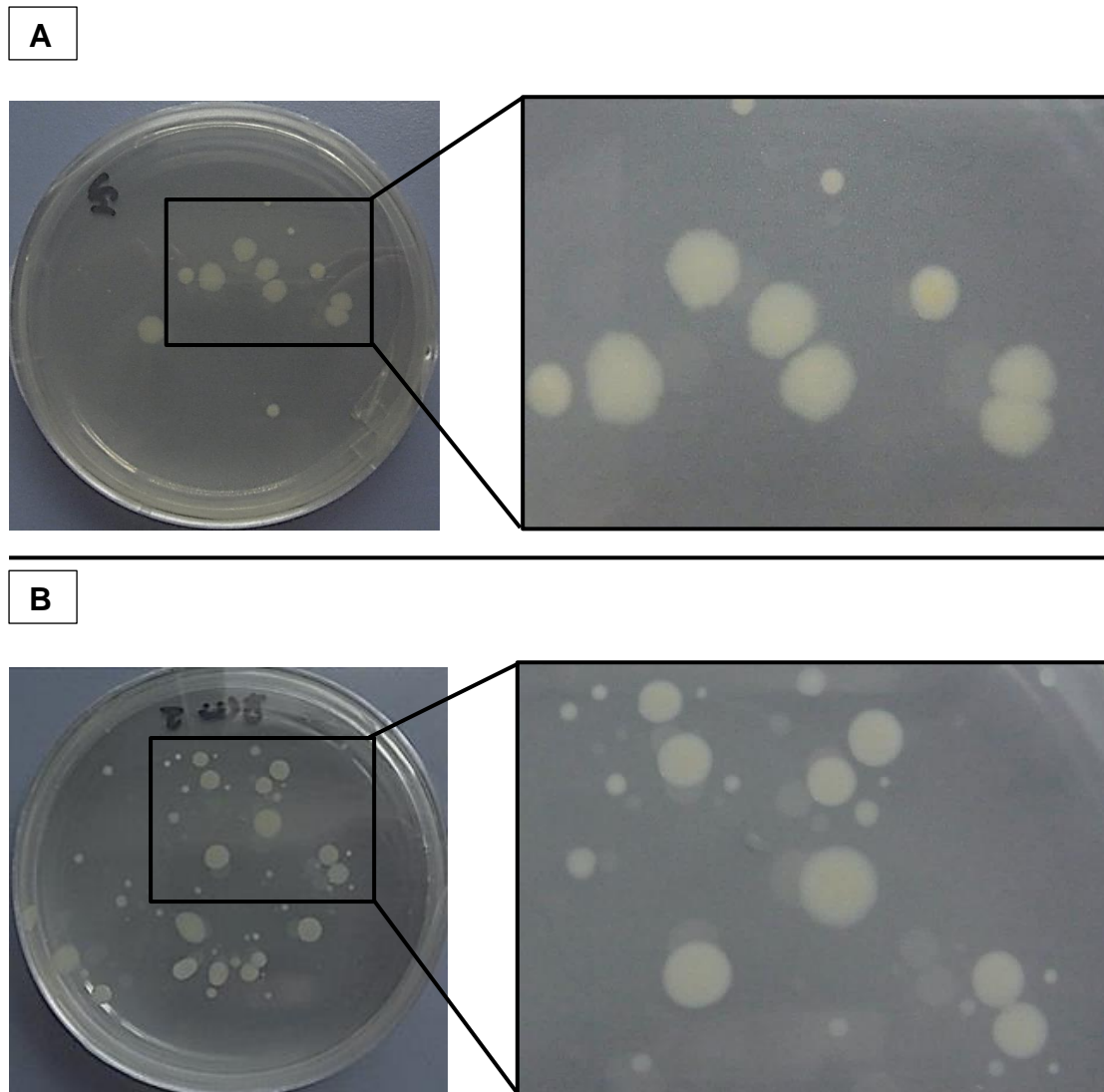
Bei Betrachtung der Agarplatten mit den Biofilmpuben aus den Berieselungswässern von CHM und Vow konnten Unterschiede in der Morphologie der koloniebildenden Einheiten festgestellt werden. In der Tabelle sind die Fakten zusammengefasst.

**Tabelle 4 Morphologische Unterschiede der Agarplatten von CHM und Vow**

<b>Morphologische Charakteristik</b>	<b>Basaltgewebe 2 - Leinwand</b>	<b>Basaltgewebe 3 - Leinwand /Köper</b>	<b>Glasgewebe</b>	<b>PES-Gewebe</b>
<b>CHM</b> graue Kolonien mit gelappten Rand, konvexes Profil	dominierend	dominierend	dominierend	dominierend
<b>CHM</b> weiße Kolonien mit glatten Rand, konvexes Profil	untergeordnet	dominierend	untergeordnet	untergeordnet
<b>Vow</b> Graue Kolonien mit glattem Rand, konvexes Profil	dominierend	untergeordnet	dominierend	dominierend
<b>Vow</b> weiße Kolonien mit glattem Rand, konvexes Profil	untergeordnet	dominierend	untergeordnet	untergeordnet

In Abbildung 23 sind in der oberen Reihe die Verteilungsmuster der weiß- und graufarbigem KBE stellvertretend von der Basaltleinwandprobe (CHM) dargestellt. Die untere Reihe zeigt das Erscheinungsbild der kultivierbaren Mikroorganismen aus einem Biofilmabschnitt der Basaltleinwandprobe (Vow).





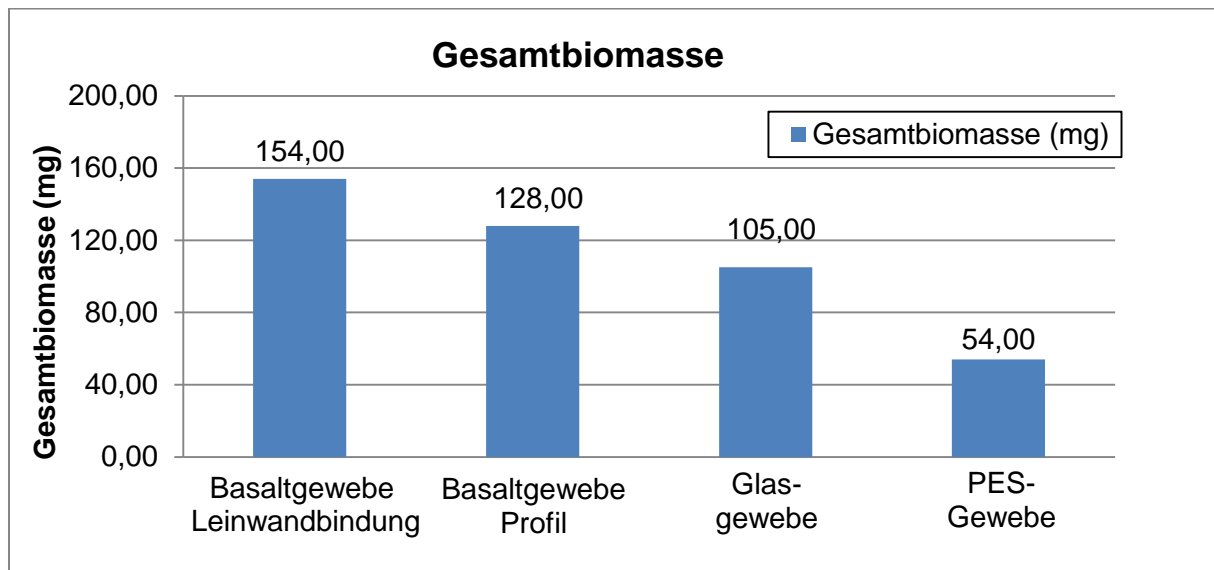
**Abbildung 23 Darstellung der Ausplattierungsergebnisse von Biofilmausschnitten**

**A:** Ausplattierungsergebnis einer Biofilmprobe von CHM. Dargestellt ist das Verteilungsmuster der weiß- und graufarbenen koloniebildenden Einheiten stellvertretend aus einem Biofilmausschnitt der Basaltleinwandprobe. **B:** Ausplattierungsergebnis einer Biofilmprobe von Vow. Das Erscheinungsbild der Agarplatten ist geprägt von den weiß- und graufarbenen KBE.

### 5.2.2 Gesamtbiomassenbestimmung auf den Geweben

Die Angaben der Biomassen beziehen sich auf eine Gewebeoberfläche der Aufwuchsträger von 50 cm<sup>2</sup>. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Trockenmassen der Biomassen der CHM-Biofilmpuben aufgeführt. Die Biomassel (mg) errechnete sich aus der Differenz des Trockengewichtes eines Gewebes nach dem ersten Trocknungsprozess und dem Probengewicht nach dem Trocknungsvorgang nach dem Ultraschallbad. Auf den Basaltgeweben konnte mit 154 mg (Leinwand) und 128 mg (Leinwand/Köper) die höchste Biomasse

nachgewiesen werden. Das Glasgewebe wies eine Biomasse von 105 mg auf. Auf dem PES-Gewebe konnte mit 54 mg die geringste Biomasse bestimmt werden. Die Auswertung des Basaltgewebes mit den abgeklebten Geweberändern war aufgrund der Auflösung der Gewebestruktur nicht sinnvoll. Für die tatsächlich mit Biofilm bewachsene Aufwuchsfläche des Gewebes ist die Kenntnis über die Gesamtoberfläche allerdings wenig nützlich.

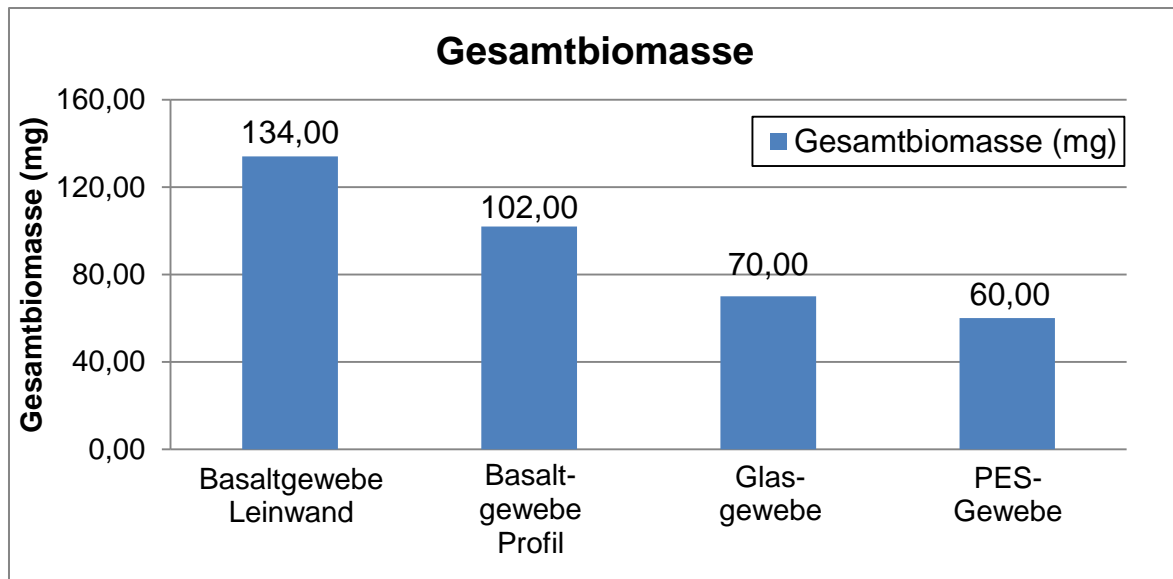


**Abbildung 24 Bestimmung der Biomassen auf den Geweben (CHM)**

Die Abbildung zeigt die bestimmten Biomassen auf den Geweben.

Die Ergebnisse der Biomassebestimmung der Proben basierend auf den Vow-Berieselungswässern sind in der Abbildung 26 aufgeführt. Die Gewebeoberfläche konnte auf 50 cm<sup>2</sup> berechnet werden.

Vergleichend zu den CHM-Proben konnte eine identische Reihenfolge der ermittelten Biomassen festgestellt werden. Die Basaltproben wiesen eine deutlich höhere Biomasse im Vergleich zu dem Glas- und PES-Gewebe auf.



**Abbildung 25 Bestimmung der Biomassen auf den Geweben (Vow)**

Die Abbildung zeigt die bestimmten Biomassen auf den Geweben.

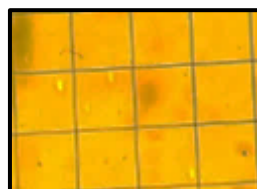
### 5.2.2 Anfärben der Zellen aus den Biofilmausschnitten mit Acridinorange

Mit der angewendeten Farbstoffkonzentration konnte bei der mikroskopischen Auswertung eine geringe Hintergrundfluoreszenz und eine homogene Verteilung des Farbstoffes beobachtet werden. Im Vergleich zu der CHM – Probe waren die ungefärbten Einzelzellen aus der Biofilmprobe von Vow auffällig. Die Biofilmpuben von CHM waren mit Ausnahme des Glas- und PES-Gewebe von einer 100 % igen Zellanfärbung gekennzeichnet. In der Gesamtheit der untersuchten Proben dominierten bei CHM und Vow ellipsenartige Einzelzellen. Mit einem Objektmikrometer konnten diese auf einer durchschnittlichen Zellgröße von ca. 5 µm bestimmt werden. Tabelle 5 stellt die Ergebnisse der Biofilmpuben von den Geweben von CHM und Vow dar.

**Tabelle 5 Ergebnisse der Acridinorangefärbung von CHM und Vow**

	<b>Basaltgewebe Leinwand</b>	<b>Basaltgewebe Köper</b>	<b>Glasgewebe</b>	<b>PES-Gewebe</b>
<b>CHM</b>	- im Mittelwert (n=4) 22 grün-fluoreszierende Einzelzellen von insgesamt 22 Einzelzellen  <u>Zusammen- gefasst:</u> - 100%ige Zellanfärbung	- im Mittelwert (n=4) 20 grün-fluoreszierende Einzelzellen von insgesamt 20 Einzelzellen  <u>Zusammen- gefasst:</u> - 100%ige Zellanfärbung	- im Mittelwert (n=4) 32 nicht fluoreszierende Einzelzellen von insgesamt 32 Einzelzellen  <u>Zusammen- gefasst:</u> - 0%ige Zellanfärbung	- im Mittelwert (n=4) 2 grün-fluoreszierende Einzelzellen von insgesamt 10 Einzelzellen  <u>Zusammen- gefasst:</u> - 20%ige Zellanfärbung
<b>Vow</b>	- im Mittelwert (n=4) 3 grün-fluoreszierende Einzelzellen von insgesamt 12 Einzelzellen  <u>Zusammen- gefasst:</u> - 25 %ige Zellanfärbung	- im Mittelwert (n=4) 2 grün-fluoreszierende Einzelzellen von insgesamt 14 Einzelzellen  <u>Zusammen- gefasst:</u> - 14 %ige Zellanfärbung	- im Mittelwert (n=4) 1 grün-fluoreszierende Einzelzellen von insgesamt 15 Einzelzellen  <u>Zusammen- gefasst:</u> - 6 %ige Zellanfärbung	- im Mittelwert (n=4) 2 grün-fluoreszierende Einzelzellen von insgesamt 10 Einzelzellen  <u>Zusammen- gefasst:</u> - 20 %ige Zellanfärbung

In Abbildung 24 sind stellvertretend für die Biofilmproben mit ungefärbten Einzelzellen ein Sichtfeld mit drei ungefärbten Einzelzellen der Basaltleinwandprobe von Vow dargestellt.



(1)

**Abbildung 26 Ergebnis der Acridinorangefärbung unter Blaulichtanregung der Basaltbiofilmprobe**

Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus dem betrachteten Okularsichtfeld. (1) ungefärbte ellipsenförmige Einzelzellen

## 6 Diskussion

Mit den Aufwuchsversuchen von Biofilm auf verschiedenen textilen Aufwuchsträgern bestehend aus Basalt-, Glas- und PES-Garnen sollten der Materialeinfluss und Struktureinfluss der Aufwuchsträger auf die Biofilmentwicklung untersucht werden. Weiterhin sollten die in der Forschungsarbeit angewendeten Methoden hinsichtlich der Eignung für die Quantifizierung und Qualifizierung der Biofilme bewertet und verglichen werden.

Die ermittelten Zellzahlen pro ml (Gesamt-und Lebendzellzahl) unter der Verwendung der Berieselungswasser als Inokulum sind nur als Richtwert anzusehen. Es kann davon ausgegangen werden, dass nur ein unbekannter Anteil der Zellen des Inokulums kultiviert wurden und für die bakterielle Adhäsion zur Verfügung stand. Nikolaos beschreibt, dass je nach Habitat mit der Kultivierung von Mikroorganismen nur 0,001%-10% der Gesamtzellzahl erfasst werden [Nikolaos, 2011]. Grundsätzlich gilt, dass die Mikroorganismen, welche bei den festgelegten Parametern (beispielsweise pH-Werte und Sauerstoffgehalt, vorherrschende Kohlenstoffquelle) ihr Wachstumsoptimum aufweisen, vorrangig die mikrobielle Zusammensetzung dominieren. Die schwächer an die Umgebungsbedingungen adaptierten Mikroorganismen werden aufgrund von Mangelercheinungen in ihrem Wachstum negativ beeinflusst oder aufgrund der Dominanz der optimal adaptierten Mikroorganismen in der Population verdrängt [Fuchs, 2007]. In Folge dessen, variiert die mikrobielle Zusammensetzung in jedem Kultivierungsgefäß und die Population der Biofilme kann nur als ein Teil der ursprünglich als Inokulum verwendeten Mikroorganismenpopulation angesehen werden.

### 6.1 Biofilmentwicklung auf den Aufwuchsträgern

Als Gemeinsamkeiten der untersuchten Aufwuchsträger sind die Bindungsart – Leinwandwandbindung mit einem Oberflächenprofil (strukturierte Basaltgewebe wird gesondert betrachtet) und die mit einer glatten Oberfläche vorliegenden Fasern bzw. Garne zu nennen. Unterschiede sind in der Tendenz der Reibungsaufladung und im

Ausgangspolymer der Fasern („organisch“ (PES-Faser)) und mineralisch (Basalt- und Glasfaser) zu finden. Bei dem PES-Gewebe handelt es sich um ein biologisch abbaubares Material, welches zu Biomasse, Kohlenstoffdioxid und Wasser zerlegt werden kann.

Anhand des Basaltgewebes mit den verwendeten Klebestreifen wurde der Einfluss der von dem 0,9 cm kleinen Magnetstäbchen verursachten Wasserströmung mit Scherkraftwirkung demonstriert. Mit dem Ablösen der Klebestreifen war die Gewebestabilität nicht mehr gewährleistet. In der Folge kam es zu Verformungen des Gewebes. Die Ausprägung der Biofilmdicke und der bevorzugte Besiedlungsort wurden wesentlich von den Einflüssen der hydrodynamischen Effekte beeinflusst. Der Einfluss der hydrodynamischen Effekte auf die Biofilmentwicklung konnte auch auf den „stabilen“ Geweben aufgezeigt werden. Bei einer mittigen Position des Magnetstäbchens in der Glasflasche führen die axialen Strömungskräfte direkt an dem Scheitelpunkt zu hohen Abscherkräften. Dies erschwert die Anhaftung von Mikroorganismen. Bei zu geringen Adhäsionskräften zwischen Materialoberfläche und Mikroorganismen oder in der späteren Biofilmentwicklung können bereits geringe Scherkräfte eine Ablösung der Organismen bewirken. Je geringer der Einfluss der Scherkräfte ist, desto gleichmäßiger (vorausgesetzt die Adhäsionskräfte im Biofilm ermöglichen dies) ist der Biofilm. Dies ist bei fast allen Biofilmproben auf der Gewebeprobe direkt unterhalb des Flüssigkeitsspiegels zu beobachten.

Die Gewebeverschiebung aus der senkrechten Ebene führt zu einer einseitigen Krafteinwirkung der Strömungskräfte, in Folge dessen es zu einer verstärkten Abtragung des Biofilms auf der zu dem Magnetstäbchen zugewendeten Gewebeseite kam. Die hier wirkenden Windschatteneffekte führten zu einer verstärkten Biofilmentwicklung. Auf Grundlage der wirkenden Kräfte kann das geringe Biofilmdickenwachstum auf der Mitte der Gewebeflächen im Vergleich zu der übrigen Gewebefläche erklärt werden. Verwirbelungseffekte und demzufolge der stetige Kontakt von Material und Mikroorganismen an der Materialoberfläche begünstigen die randständige Biofilmentwicklung. Liefeyth und Scheibner untersuchten in dem Forschungsprojekt „Entwicklung von 3D - Textilien mit sehr großen reaktiv wirksamen Oberflächen für modulare Bioreaktorsysteme zur biologischen Abwasserreinigung“ das Biofilmwachstum auf 3D - Textilien. Die Anordnung der Textilien in einem röhrenartigen Bioreaktor erfolgte mit Längs – bzw.

Querdurchströmung einer Flüssigkeit. Bei Untersuchungen der Biofilme konnte zusammenfassend der Einfluss von äußeren Systemparametern, zum Beispiel Strömungsparameter, auf die Struktur der Biofilme in der Gleichgewichtsphase beobachtet werden [Liefeith et al., 2008-2011].

Der Ablauf der Biofilmentwicklung erfolgte bei allen Geweben in der ersten Versuchswoche mit der Ausbildung von Mikrokolonien bevorzugt an der Randseite des Gewebes und stark ausgeprägt in Scheitelnähe. Auf Grundlage der entstandenen diffusiven Grenzschicht auf der Gewebeoberfläche konnte in der ersten Versuchswoche die erste Phase (Anlagerung von Polymeren) und zweite Phase (Anlagerung von Zellen) der Biofilmentwicklung nachvollzogen werden. Die Reifung des Biofilms (dritte Phase der Biofilmentwicklung) mit dem exponentiellen Wachstum der Zellen konnte bei dem Basalt-, Glas-, und PES-Gewebe ab der zweiten Versuchswoche bis zu dem Versuchsende mit der kontinuierlichen Zunahme der Biofilmdicke und der Biofilmgröße beobachtet werden [vgl. Höll, 2007]. Aus makroskopischer Sicht betrachtet wiesen die PES-Gewebe von CHM und Vow im Vergleich zu den anderen Materialien eine geringere Biofilmdicke auf. Die beobachtete lokale Ausbildung von Mikrokolonien in der ersten Phase der Biofilmentwicklung auf alle untersuchten Materialoberflächen könnte in einem Zusammenhang mit der hydrophoben Eigenschaft der Gewebe und der damit verbundenen Konzentrierung der Zellen in Flüssigkeit in Tropfenform (sogenannte Hot Spots) stehen. Diese hohen Zelldichten begünstigen die Biofilmbildung [Venzmer, 2008]. Die auf dem Basaltgewebe in der ersten Versuchswoche beschriebenen „fadenförmigen“ Anhaftungen sind auf die aus der Materialoberfläche ragenden Fäden (aufgrund der Filamentbrüchigkeit des Gewebes) zurückzuführen. Die teilweise offenen Abstände zwischen den rechtwinklig angeordneten Fäden lassen an dieser Stelle eine erhöhte Wasserdurchlässigkeit zu und könnten u.U. zu einer Sogwirkung mit verminderter Biofilmbildung geführt haben. Die verminderte Biofilmbildung ist besonders bei dem Glasgewebe deutlich geworden.

Die Leinwandbindung der Gewebe in Kombination mit einer hohen flächenbezogenen Masse der Gewebe (eine Ausnahme stellt das Glasgewebe dar) beeinflusst mit Ausbildung eines Gewebeprofiles die Biofilmentwicklung. Das in den mikroskopischen Aufnahmen von Basalt- und PES-Gewebe erkennbare Biofilmwachstum besonders an den Garnrändern bestätigt die Annahme. Auf den

Basaltgeweben mit den rausten Oberflächen konnte die stärkste Ausprägung der Biofilme am Versuchsende festgestellt werden. Das PES-Gewebe mit der zweitrausten Oberfläche wies eine Biofilmentwicklung mit dünneren Biofilmdicken als die Biofilme auf den Basaltgeweben auf. Die geringste Biofilmentwicklung konnte auf dem Glasgewebe mit der glatten Gewebeoberfläche nachgewiesen werden. Schlussfolgernd könnte ein Zusammenhang zwischen der Rauigkeit der Gewebeoberfläche und der Biofilmentwicklung bestehen. Marquardt et al. beschrieb im Jahr 1994, dass zur Verhinderung von Biofouling auf einer Oberfläche die Ausprägung der Oberflächenrauigkeit kleiner als die Größe der Mikroorganismen sein sollte [Marquardt et al., 1994]. In diesem Sinn bestätigt er den Zusammenhang zwischen Oberflächenrauigkeit und der Biofilmbesiedlung. Mit Zunahme der Rauigkeit einer Oberfläche können ebenfalls Verwirbelungseffekte auf der Materialoberfläche auftreten.

Im Vergleich zu den anderen Geweben führt die Kombination der Bindungsformen auf den Basaltgeweben zu einer unebeneren Oberfläche mit Ausbildung von Windschatten an den Körperfäden. Die Ausprägung des Biofilms (Gewebestruktur mit der Garnanordnung ist nicht erkennbar) am Versuchsende zwischen den Körperfäden kann auf den geringeren Einfluss der Scherkräfte im Vergleich zu der Oberkante der Körperfäden zurückgeführt werden. Zu Beginn der Biofilmentwicklung konnte als bevorzugte Position der Ausbildung von Mikrokolonien der Windschattenbereich der Körperfäden mit gering wirksamer Scherkräfteinwirkung beobachtet werden. Die Basaltprobe mit Profil wies anfänglich einen zeitlichen Rückstand von ca. einer Woche auf. Am Versuchsende waren Unterschiede in dem Biofilmwachstum jedoch kaum erkennbar. Eine Erklärung für die zeitlichen Unterschiede in der Biofilmentwicklung ist die Flüssigkeitsströmung mit Verwirbelungen direkt auf der Gewebeoberfläche. Dies wurde an den biofilmfreien Oberkanten der Körperfäden deutlich. Das Oberflächenprofil der Gewebe führte allerdings auch zu Windschatteneffekten der Körperfäden. Mit verringerter Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit erfolgte in diesem Bereich die Anhaftung von Mikroorganismen leichter als an dem restlichen Gewebe.

Das Biofilmwachstum der Gewebe mit den Berieselungswässern von CHM und Vow als Inokulum unterschieden sich in der zeitlichen Biofilmentwicklung und der Ausprägung des Biofilms. Auf dem Basalt- und Glasgewebe konnte ein ungefährer



zeitlicher Rückstand der Gewebeproben von Vow von ca. 14 Tage nachgewiesen werden. Dies zeigte sich in der späteren flächigen Ausprägung des Biofilms mit einzelnen lokalen Mikrokolonien. Als Erklärung kann die unbekannte mikrobielle Zusammensetzung der Berieselungswässer genannt werden. Mögliche Unterschiede der Mikroorganismen u.a. hinsichtlich des Ernährungszustands, der Wachstumsphasen und der Organismenart beeinflussen die Biofilmentwicklung [Höll, 2010]. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse zwischen beiden Abluftreinigungsanlagen ist basierend auf der unbekannten mikrobiellen Zusammensetzung und anderer Faktoren wie Unterschiede in der Betriebsführung nicht möglich. Das Wissen über die zeitlichen Differenzen in der Biofilmentwicklung könnte möglicherweise ein Ansatz für die Erklärung der Leistungsunterschiede der Abluftreinigungsanlagen darstellen.

Aufgrund der unbekannten mikrobiellen Zusammensetzung der Berieselungswässer und in Folge der fehlenden Kenntnis der Eigenschaften der Zelloberfläche (Hydrophobizität und Oberflächenladung) können die wirkenden Adhäsionskräfte an den Materialoberflächen nur im Ansatz nachvollzogen werden. Die Biofilmentwicklung könnte u.U. auch von Mikroorganismen, die Zellorganellen besitzen, mit denen eine Anhaftung an die Oberfläche möglich ist (z.B. mit der Bewegung eines Pilus) beeinflusst werden. Da die Zusammensetzung der Biozönose unbekannt ist, kann dazu keine Aussage getroffen werden. Für die Adhäsion der Bakterienzellen mit einer angenommenen hydrophilen Oberflächeneigenschaft muss bedingt durch die wirkenden Abstoßungskräfte der gegensätzlichen Hydrophobizitätseigenschaften (Materialien sind hydrophob) gelten, dass die Anziehungskräfte (elektrostatischen und van der Waals- Kräfte) mindestens genau so groß sein müssen. Die größere Reichweite der van der Waals-Kräfte und der elektrostatischen Kräfte vergleichend zu dem hydrophoben Effekt könnte möglicherweise einen Einfluss auf das Biofilmwachstum haben. Eine hydrophobe Zelloberflächeneigenschaft der Mikroorganismen begünstigt aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen mit der Gewebeerfläche die Bioadhäsion. Zusätzlich werden die elektrostatischen Kräfte zwischen Bakterienoberfläche und Gewebe wirksam [Rumpf, 2009]. Bei einer angenommenen negativen Nettoladung der Bakterienoberfläche [Höll, 2010] kommt es bei den PES-Geweben, die eine negative Aufladung aufweisen kann, zu Abstoßungseffekten. Die Neigung der Glas- und der Basaltgewebe zu eine positiven

Aufladung begünstigt hingegen die Anziehung der Mikroorganismen an die Gewebeoberfläche. Die Unterschiede in der Biofilm-entwicklung kann auf die Abstoßungskräfte bzw. die Anziehungskräfte zurückgeführt werden [Lüttgens, 2000; Horton, 2008].

Eine Forschungsgruppe des INNOVENT e.V. Jena untersuchte das Biofilmwachstum auf Basalt und verglich das Wachstum auf Gestein, einer Faser und Gewebe. Die Versuche wurden als Abklatschversuche mit dem Organismen *Escherichia coli* ausgeführt. Die Gewebegröße wurde auf 1\*1 cm und die Fadenlänge auf 2 cm festgelegt. Im Ergebnis konnte eine antimikrobielle Wirkung von Basalt nicht ausgeschlossen werden [Ziegler von INNOVENT e.V., 2013]. Dies steht im Widerspruch zu dem Ergebnisse der Forschungsarbeit. Die Jenaer Forscher setzen im Gegensatz zu dem Versuchsaufbau in der Bachelorarbeit ein sehr geringes Probenvolumen ein. Aufgrund des geringen Probenvolumens des Fadens und des Gewebes könnten die Messergebnisse verfälscht worden sein. Für aussagekräftige Ergebnisse sollte das eingesetzte Probenvolumen-/Masse entsprechend groß sein. Abklatschversuche sind bedingt durch die kurze Kontaktzeit für die Mikroorganismenübertragung, der fehlenden Grenzfläche und dem fehlenden Medium als Voraussetzung für eine Biofilmentwicklung kein optimal ausgewählter Versuchsaufbau. Eine Nährstoffversorgung der Mikroorganismen kann ebenfalls nicht gewährleistet werden. Hingegen werden in Versuchsaufbau mit den eingetauchten Geweben die Kriterien für eine Biofilmentwicklung hergestellt. In Folge dessen, kann das Ergebnis der Bachelorarbeit als schlüssig erachtet werden. Die Verwendung von Mikroorganismen mit hydrophober und negativ geladener Zelleigenschaft in der Versuchsdurchführung begünstigt das Biofilmwachstum auf dem Basaltgewebe.

Das beobachtete Biofilmwachstum in der Bachelorarbeit auf den Glasgeweben findet Bestätigung in der Arbeit von Prouty et al. Der in der American Society for Microbiology im Jahr 2003 veröffentlichte Artikel beschreibt Untersuchungen zu Biofilmformationen u.a. auf Glasflächen in Abhängigkeit der eingesetzten Phänotypen von *Salmonella enterica* [Prouty et al., 2003]. In fast allen Teilgebieten der Biologie finden für die Kultivierung von adhären Zellen Kulturgefäße aus Glas Anwendung. Das Borosilicatglas (Bezeichnung wegen Bortrioxidgehalt) mit

Hauptbestandteilen von Siliziumdioxid und Metalloxiden weist die Eigenschaft auf, dass bei Einwirken von Wasser und Säuren Ionen (beispielweise Natriumionen) aus dem Material herausgelöst werden und an deren Stelle Hydronium- und Hydroxidionen angelagert werden. An der sich ausbildenden dünnen und porenarmen Silicagelschicht wird die Adsorption von Proteinen leicht ermöglicht. Bei proteinhaltigen Medien führt dies zu der Ausbildung einer Eiweißdoppelschicht und das Material weist eine zellwachstumsfördernde Eigenschaft auf [Ackermann et al, 1999]. Weiterhin kann das Glasgewebe ein geeignetes Aufwuchsmaterial bei Auftreten von hydrophoben Wechselwirkungen mit Hot Spot Ausbildung und der Verwendung von Mikroorganismen mit negativer Ladung der Zelloberfläche darstellen [Venzmer, 2008].

Die Ergebnisse von Blackman et al. von 1996 stehen im Einklang mit dem in dieser Arbeit beobachteten Biofilmwachstum auf dem PES-Gewebe. In diesem Versuchsaufbau wurde sieben Tagen nach Inkubation mit *Listeria monocytogenes* ein Bedeckungsgrad des Materials von 40% beobachtet. Die geringe Ausbildung der Biofilmentwicklung wurde von den Autoren des Artikels auf das Minimalmedium (tryptisch verdaute Sojabohnen-Bouillon) zurückgeführt [Blackman et al., 1996]. Polyester als Biomaterial zählt zu den hydrolysierbaren Polymeren. Es kommt zur Spaltung der funktionellen Gruppen, wodurch der Polyester zu einer Carbonsäure und einem Alkohol abgebaut wird. Allerdings könnte die biologisch abbaubare Eigenschaft des Kunststoffes über einen längeren Zeitraum betrachtet möglicherweise zu einem theoretischen Materialverlust des Aufwuchsträgers führen. Aufgrund der Verfügbarkeit des Materials als Kohlenstoffquelle für Mikroorganismen kann dieses Material eine optimalere Nährstoffversorgung vergleichend zu dem Basalt- oder Glasgewebe bieten [Pfeil, 1994]. Ein Grund für die im Vergleich zu den anderen Geweben schwächere Ausprägung des Biofilmwachstums kann hingegen in den stark wirksamen elektrostatischen Abstoßungskräften zu finden sein.

## 6.2 Untersuchungen auf Zellebene

Die ermittelten Gesamtzellzahlen pro  $\text{cm}^2$  Gewebe wiesen bei CHM ein Minimum von  $8 \cdot 10^6$  Zellen/ $\text{cm}^2$  PES-Gewebe bis zu einem Maximum von  $2 \cdot 10^9$  Zellen/ $\text{cm}^2$  Glasgewebe auf. Die Basaltproben lagen mit Werten von  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ $\text{cm}^2$

Basaltgewebe mit Leinwandbindung und  $1 \cdot 10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup> Basaltgewebe mit Leinwand/Köperbindung im Mittelfeld. Die Messwerte der Vow-Biofilmproben konzentrierten sich in dem Messbereich von  $2 \cdot 10^7$  Zellen/cm<sup>2</sup> Glasgewebe bis  $9 \cdot 10^7$  Zellen/cm<sup>2</sup> PES-Gewebe. Die Basaltproben wiesen Werte von  $3 \cdot 10^7$  Zellen/cm<sup>2</sup> Basaltgewebe mit Leinwandbindung und  $5 \cdot 10^7$  Zellen/cm<sup>2</sup> Basaltgewebe mit Leinwand/Köperbindung auf. Diese Ergebnisse der Aufwuchsversuche konnten durch die Zellzahlbestimmung der Biofilmausschnitte ansatzweise bei CHM bestätigt werden. Die geringe Biofilmentwicklung auf dem PES-Gewebe (CHM) ist im Vergleich zu der am geringsten bestimmten Zellzahl schlüssig. Die am höchsten ermittelte Zellzahl des Biofilmausschnittes auf dem Glasgewebe und das Ergebnis des Biofilmwachstums deuten auf den Einfluss der vollständigen Gewebeauflösung des Glasgewebes hin. Das Ergebnis des Biofilmwachstums auf den Basaltproben (CHM) und die ermittelten im Vergleich zu dem PES-Gewebe höheren Zellzahlen der Biofilmausschnitte bestätigt die Ergebnisse der Biofilmentwicklung der Aufwuchsversuche. Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung der Vow- Biofilmproben und die Unterschiede in dem Biofilmwachstum auf den Geweben konnten nicht bestätigt werden. Die im Vergleich zu den Biofilmproben von CHM beobachtete langsamere Biofilmentwicklung der Vow- Biofilmproben spiegelte sich ebenfalls nicht in den ermittelten Zellzahlen. Möglicherweise variieren die EPS-Anteile in den Biofilmen oder es wirken unterschiedliche Adhäsionskräfte zwischen Materialoberfläche und dem aufgelagerten Biofilm. Starke Adhäsionskräfte erschweren die Ablösung der Zellen von den Geweben. Die vollständige Strukturauflösung des Glasgewebes während der Methodendurchführung und die ermittelte hohe Zellzahl zeigen, dass das Ergebnis der Zellzahlbestimmung der Biofilmabschnitte im Zusammenhang mit der Strukturintaktheit der Gewebe steht. Dies ist erklärbar mit der maximal möglichen Zugänglichkeit der Desorptionslösung in dem Gewebe bzw. den Garnen. Ohne Untersuchung der Biofilme (beispielsweise mit dem Anteil an EPS) kann ein Zusammenhang zwischen der Biofilmentwicklung und der Zellzahlen einer Biofilmprobe nur theoretisch angenommen werden. Die betrachteten Vergleiche sind kritisch zu hinterfragen. Flemming (2002) beschreibt als durchschnittliche Gesamtzellzahl  $10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> Rohrleitungsoberfläche in dem Verteilungsnetz der Kanalisation. Die durchschnittliche Koloniezahl auf einer Rohrleitungsoberfläche soll  $10^3$  KBE/cm<sup>2</sup> Oberfläche betragen [URL-4]. Die Abweichungen in den Zellzahlen mit teilweise deutlich höheren Zellzahlen (z.B. Glasgewebe CHM) lässt sich auf

verschiedenen Faktoren zurückführen: die Zusammensetzung innerhalb der Biofilmpopulation kann je nach vorliegenden Umweltfaktoren variieren, die EPS-Anteile in dem Biofilm können variieren. Zudem können die betrachteten und vergleichenden Biofilme in verschiedenen Phasen der Biofilmentwicklung vorliegen. Die gezüchteten Biofilme auf den Geweben wurden in einem Medium mit konstant hoher Stickstoffquelle kultiviert. Die Stoffwechselkonkurrenz zu suspendierten Zellen sollte mit dem täglichen Mediumswechsel gering gehalten werden. Die ermittelte hohe Zellzahl pro cm<sup>2</sup> Glasgewebe könnte mit der vollständigen Materialauflösung des Glasgewebes vergleichend zu den Basalt- und PES-Gewebe erklärt werden.

Die Ergebnisse des Ausplattierens zeigten, dass bei CHM graufarbige koloniebildende Einheiten mit gelappten Kolonierand bei der Biofilmprobe der Glas-, Basaltleinwand- und PES-Gewebe dominierten. Das Basaltgewebe mit Profil stellte eine Ausnahme dar: hier wiesen die weißfarbigen Kolonien eine Dominanz auf. Bei Vow wiesen die koloniebildenden Einheiten der Biofilmproben von Glas-, Basaltleinwand- und PES-Gewebe vorwiegend eine gräuliche Färbung und einen glatten Kolonierand auf. Die Besonderheit stellte die Basaltgewebeprobe mit Profil dar. Die weißlichen KBE prägten das Erscheinungsbild. Die Abweichungen in der bestimmten Lebendzellzahl der jeweiligen Proben legen nahe, dass die Gesamtanzahl der gewachsenen Kolonien von Probe zu Probe variiert, sodass mit der Bezeichnung Dominanz nur eine Tendenz des Vorfindens der Kolonie mit der beschriebenen Morphologie beschrieben wird. Ohne weitere Untersuchungen zur Materialoberflächen mit Bestätigung der vollständigen Ablösung der Zellen, können die ermittelten Werte nur als Richtwerte verstanden werden. Auf Basis der Unkenntnis der mikrobiellen Zusammensetzung der Berieselungswässer kann von Versuchsbeginn an die Organismenarten in jeder Glasflasche variiert haben und schlussfolgernd das Zellzahlergebnis verfälschen. Das Vorfinden von morphologisch verschiedenen Kolonien bestätigt die unterschiedliche mikrobielle Zusammensetzung der Berieselungswässer untereinander. Die Lebendzellzahlen sind bei den CHM-Biofilmproben geringer als die Gesamtzellzahl, da nicht alle Mikroorganismen in einem Biofilm lebens- und vermehrungsfähig sind [Fuchs, 2007]. Die Ergebnisse der Vow-Biofilmproben weisen einen nicht signifikanten Unterschied der Zellzahlen auf. Eine mögliche Ursache könnte eine nicht sterile Methodendurchführung oder die unterschiedlichen Wachstumsphasen der Biofilme sein [Steinbüchel, 2013].

Bei der Acridinorangefärbung konnte festgestellt werden, dass die CHM-Biofilmproben im Vergleich zu den Vow-Biofilmproben eine 100% ige Zellanfärbung mit grün fluoreszierenden Einzelzellen aufwiesen. Die Prozentangabe bezieht sich auf das Verhältnis von gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl. Die unbekannte Zusammensetzung der Mischpopulation und die variierende Mikroorganismenanteil in jeder Glasflasche können eine Erklärung für das unterschiedliche Färbeergergebnis sein. Eine Anfärbung der Zellen erfolgt, wenn eine Farbkomplexbildung an den sauren Komponenten der Mikroorganismen möglich ist. Beispielsweise ist dies an den Mycolsäuren der mycobakteriellen Zellwand möglich [Kaden, 2009]. Remde beschreibt, dass es möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem Schädigungsgrad von Bakterienzellen und dem Färbeergergebnis existiert. Eine mit Rotfärbung überlagerte Grünfärbung der Zellen wird bei geschädigten Zellen sichtbar. Dies erklärt sich mit der Farbstoffkonzentrierung in den Zellen [Remde, 1998]. Die Ergebnisse der Acridinorangefärbung könnten zusätzlich zu den Ausplattierungsergebnissen der Agarplatten als ein weiterer Beleg für die Unterschiede der mikrobiellen Zusammensetzung der Berieselungswässer von CHM und Vow gedeutet werden.

### 6.3 Gesamtbiomassebestimmung

Die Bestimmung der Gesamtbiomassen auf den Geweben mit einer Aufwuchsfläche von 50 cm<sup>2</sup> zeigt, dass die Basaltleinwandproben mit 154 mg (CHM) und 134 mg (Vow) die höchsten gemessenen Biotrockenmassen aufwiesen. Mit einer Biomassedifferenz von 26 mg (CHM) und 32 mg (Vow) zu der Basaltleinwandprobe wiesen die Basaltproben mit der strukturierten Oberfläche das zweitbeste Ergebnis auf. Das Glasgewebe von CHM war mit 105 mg Biomasse nah an den bestimmten Biomassen der Basaltleinwandproben. Auf dem PES-Gewebe konnte mit nur 54 mg (CHM) und 60 mg (Vow) vergleichend zu den Basaltleinwandproben die geringste auf den Trägermaterialien aufgewachsene Biomasse nachgewiesen werden. Die bestimmte Biomasse von 70 mg auf dem Glasgewebe von Vow wies nur eine Differenz von 10 mg zu dem PES-Gewebe auf. Mit der beschriebenen Eigenschaft der Basaltproben - der leichten Filamentbrüchigkeit - kann dieser Effekt zwei Auswirkungen auf die ermittelten Biomassen haben. Die leichte Zugänglichkeit der Aufwuchsfläche führt zu einer verstärkten Biofilmbildung, andererseits führten

Filamentbrüche unter der Einwirkung der hydrodynamischen Effekte zu Material- bzw. Biomasseverlust. Die Neigung zur Filamentbrüchigkeit der Glasfaser kann ebenfalls zu Materialverlusten und damit verbunden zu Biomasseverluste führen. Bei dem Polyestergewebe könnte mit der Eigenschaft als biologisch abbaubarer Kunststoff [Pfeil et al., 1994] der Kohlenstoff in der chemischen Struktur des PES als Bestandteil der Biomasse genutzt werden, sodass die bestimmte Biomasse als ein (unbekannter) Teil der Materialzersetzung zurückzuführen ist und nicht auf die Entwicklung eines Biofilms im herkömmlichen Sinne. Insgesamt sind die ermittelten Biomassen in mg-Bereich für Fehlerquellen anfällig. Materialablösungen (selbst ein Filament) führt zu Biomasseverlust, der sich besonders in diesem Messbereich stark auswirkt und schlussfolgernd zu falschen Messergebnissen führen kann. Für die Differenzbildung der Masse der Aufwuchsträger vor und nach Ablösen des Biofilms sollte der tatsächlich für den Versuch verwendete Träger benutzt werden. Die Ergebnisse der Biomassebestimmung bestätigen die Erkenntnisse aus der Biofilmentwicklung aus den Aufwuchsversuchen. Die Basaltproben von CHM und Vow wiesen die stärkste Biofilmentwicklung auf. Dies spiegelte sich in den am höchsten bestimmten Biomassen auf den Geweben wider. Die Biofilmentwicklung mit der am geringsten ausgeprägten Biofilmdicke auf dem PES-Gewebe wies ebenfalls die geringste Biomasse auf dem Gewebe auf. Das Glasgewebe lag sowohl bei der Biofilmentwicklung als auch bei der bestimmten Biomasse im Mittelfeld.

## 6.4 Bewertung der angewendeten Methoden

Die hängende Anordnung der Probenmaterialien und die Verwendung des Rührfisches in der Glasflasche gewährleisten einen hohen Stoffaustausch zwischen den Mikroorganismen und dem umgebenden Medium. Die in der Nährlösung befindliche Aufwuchsfläche kann maximal ausgenutzt werden. Allerdings bringt der enge Zell-Mediumkontakt eine hohe Einflussnahme von hydrodynamischen Effekten mit sich und kann zum Ablösen von einzelnen Zellen oder Zellaggregaten führen. Die Immobilisierung von Mikroorganismen ausschließlich auf Trägermaterialien hat auch limitierende Faktoren: die Oberfläche der Materialien und das Erreichen einer begrenzten Biofilmdicke mit einer möglicherweise geringen Biofilmkonzentration. Unmittelbar an der Materialoberfläche stattfindende Zellkollisionen und die hydrodynamischen Effekte können zu Zellschädigungen und das Ablösen von

schwach adsorbierten Mikroorganismen führen. Aufgrund der Erscheinung der Gewebe als nicht starres Gebilde, führen Verformungen der Gewebeproben in der Ebene zu veränderten Strömungsbedingungen mit unterschiedlicher Biofilmentwicklung hinsichtlich der Position und der Struktur des Biofilms auf den Probematerialien. Mit dem Verwerfen der suspendierten Zellen mit jedem Medienwechsel konnte die Substratkonkurrenz zwischen den suspendierenden Zellen und der im Biofilm sessilen Zellen vermindert werden. Eine Substratlimitierung und der Einfluss von inhibierenden Stoffwechselendprodukten sollten nicht eintreten bzw. minimal sein. Bedingt durch eine deutlich sichtbare Trübung der Lösung bereits nach wenigen Stunden nach dem Mediumswechsel kann allerdings eine Einflussnahme der suspendierenden Zellen auf die Biofilmbildung nicht ausgeschlossen werden. Der als Folge der einwirkenden Scherkräfte eventuell eintretende Materialverlust und in dem Zusammenhang der Biomasseverlust ist als nachteilig für den Versuchsaufbau anzusehen.

Für die Anwendung der Acridinorangefärbung, die Bestimmung der Biomassen und die Quantifizierung der immobilisierten Mikroorganismen in einem Biofilm muss ein 100%iges Ablösen der Zellen von den Materialien, eine homogene Zellverteilung in der Proben-Natriumchloridlösung und steriles Arbeiten vorausgesetzt werden. Grundsätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Desorption der Biofilmzellen mit physiologischer Kochsalzlösung von den Materialien unvollständig erfolgt ist. Bei makroskopisch biofilmfrei erscheinende Materialien könnten beispielsweise zwischen den Filamenten und Fasern Biofilmrückstände vorliegen. Zusätzlich kann die Ablösung einer Faser oder eines Filaments aus dem Gewebe während des Medienwechsels oder unter dem Einfluss der Scherkräfte zu Biomasseverlust und in Folge dessen zur Ergebnisverfälschung führen. Eine Methodenverbesserung könnte eine anschließende Untersuchung der Materialien auf Zellrückstände beispielsweise mit Rasterelektronenaufnahme sein.

Mit der Bestimmung der Lebendzellzahl mit dem Anlegen einer Verdünnungsreihe und dem anschließenden Ausplattieren auf den nichtselektiven TS-Agar werden nur die kultivierbaren Mikroorganismen erfasst. Im Idealfall kann von jeder sich auf dem Nährboden sichtbaren Kolonie auf die ursprüngliche Anzahl der Mikroorganismen in der Ausgangslösung geschlossen werden. Bei zu kurzer Bebrütungszeit der



Agarplatten können nur ein Bruchteil der Mikroorganismen erfasst werden. Des Weiteren kann das Messergebnis mit dem Hintergrund der unbekannten Zusammensetzung der Population verfälscht sein. Auf Basis der annähernden Konstanthaltung des pH-Wertes zwischen der Nährlösung und dem TS-Agar sollte der Faktor pH-Wert keinen Einfluss auf die Ergebnisse aufweisen.

Die Methode für die Biomassebestimmung mit der Differenzbildung des getrockneten Materials mit und ohne Biofilm setzt das vollständige Lösen des Biofilms mittels Ultraschallbad voraus. Mit der Bestätigung der Massekonstanz der Gewebe in einem Vorversuch während des Trockenprozesses können mögliche Fehlerquellen minimiert werden. Eine weitere und direkte Methode der Biomassebestimmung könnte die Bestimmung des Kjehldahl – Stickstoffes der Biofilmprobe sein. Hierbei wird die Massenkonzentration an organisch gebundenem Stickstoff und Ammoniakstickstoff in einer Probe nach Probenaufschluss mit Schwefelsäure bestimmt. Die heterozyklischen Stickstoffverbindungen und organisch gebundenen Stickstoff als Nitrit, Nitrat u.a. werden nicht erfasst. Der Gesamtstickstoffgehalt muss aufgrund des Zusammenhanges zwischen den Wachstumsphasen von Zellen und dem Stickstoffgehalt der Zellen nicht in direkter Relation zur Gesamtbiomasse stehen. In der lag-Phase kann der Stickstoffgehalt in der Zelle geringer als in der exponentiellen Phase vorliegen. Das Ergebnis der bestimmten Biomasse kann auch durch Akkumulation von stickstoffhaltigen Speicherstoffen (z.B. Cyanophycin) verfälscht werden [Steinbüchel et al., 2013]. Des Weiteren kann auch eine Biomassebestimmung mittels Bestimmung des Gesamtproteingehaltes (z.B. Bradford-Test, Lowry-Test) erfolgen. Die problematische Ablösung des Biofilms von den Aufwuchsträgern ist dann vermeidbar, da die Aufwuchsträger samt Biofilm bei den Analysen eingesetzt werden könnten [Luttmann, 2014]. Zudem kann die Fehlerquote im Sinne eines möglichen Materialverlustes der Gewebe bei einmaliger Gewebebehandlung minimiert werden.

Mit der Beschreibung der Biofilmentwicklung der Gewebe im Versuchszeitraum konnten Unterschiede in dem Biofilmwachstum aufgezeigt werden. Auf der Grundlage der Kenntnis über die Gewebe- bzw.- Materialeigenschaften sind die Ergebnisse schlüssig. Mögliche Fehlerquellen sollten sich mit den identischen

Kultivierungsbedingungen und Versuchsdurchführungen in allen Glasflaschen auf alle Ergebnisse des Biofilmwachstums ausgewirkt haben. Mit Hilfe der fotografischen und mikroskopischen Dokumentation im Versuchszeitraum ist ein Vergleich des Biofilmwachstums auf den verschiedenen Geweben leicht möglich. Diese Methode ist aufgrund des passablen Zeitaufwandes und der sicheren Ergebnisse für die Beurteilung der Gewebe als Aufwuchsträger als geeignet zu bezeichnen. Mit der Methode der Zellzahlbestimmung von Biofilmausschnitten konnten die Ergebnisse der Biofilmentwicklung bei CHM im Ansatz und bei Vow nicht bestätigt werden. Mögliche Fehlerquellen bei der Methodendurchführung wurden ausgeschlossen. Problematisch ist die notwendige, vollständige Ablösung der Zellen des Biofilms bei intaktem Gewebe. Als eigenständige Methode ist diese nicht empfehlenswert und es muss für die Ergebnisbestätigung mindestens eine weitere Methode angeschlossen werden. Mit der Bestimmung der Biomasse auf den Geweben konnten die Ergebnisse der Biofilmentwicklung bestätigt werden. Die bestimmten Biomassen im Milligrammbereich stellen möglicherweise eine Fehlerquelle dar. Mit dem Ausschließen von Materialverlusten während dem Trockenprozess (die Gewebemassen blieben konstant) ist diese Methode für die Beurteilung der Eignung der Gewebe als Aufwuchsträger als geeignet anzusehen. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Biofilmentwicklung sind die Ergebnisse schlüssig. Der Nachteil der Methode ist die zeitaufwendige Methodenausführung. Die Acridinorangegefärbung stellt eine spezielle Untersuchungstechnik der Biofilmpuben von CHM und Vow auf den Geweben dar. Zusammenfassend konnte eine morphologische Unterscheidung der Zellen in den Biofilm von CHM und Vow festgestellt werden. Unter Beachtung der vermeidbaren Fehlerquellen dieser Methode ist diese Untersuchungstechnik für eine Differenzierung der Mikroorganismen geeignet. Der Zeitaufwand der Proben-gewinnung und Aufbereitung ist nachteilig anzusehen.

Die durchgeführten Aufwuchsversuche auf den Basalt-, Glas- und PES- Gewebe beziehen sich auf die Berieselungswässer von CHM und Vow als Inokulum. Aufgrund der unbekannten mikrobiellen Zusammensetzung der Berieselungswässer sind diese Aufwuchsversuche nicht reproduzierbar. Mit der Anwendung von geeigneteren Methoden und optimalere Voraussetzungen sollten die Aufwuchsversuche in nachfolgenden Versuchen bestätigt werden. Als Konsequenz der Unkenntnis der

mikrobiellen Zusammensetzung der Berieselungswässer gilt, dass die Ergebnisse im Vergleich der Materialien untereinander als kritisch anzusehen sind.

## 7      **Ausblick**

Für eine reproduzierbare Feststellung der Eignung der Materialien sollte bei einer nachfolgenden Versuchsdurchführung mit einer Stammlösung der Berieselungswässer mit definierter Mikroorganismenzusammensetzung gearbeitet werden. Die Kenntnis der mikrobiellen Eigenschaften der Zelloberfläche ist für eine Erklärung der wirkenden Adhäsionskräfte zwingend erforderlich. Für eine optimale Beurteilung der Materialbewertung sollte zusätzlich die Aktivität der Biofilme - beispielsweise durch Messung von Stoffwechselumsatzraten oder Fluoresceinaktivität- bestimmt werden. Interessant könnte je nach Anwendung der gezüchteten Biofilme auf den Aufwuchsträgern die Biomassebestimmung der aktiven, vitalen Biomasse sein. Eine exaktere und direktere Methode ist die Anwendung von Anhaftversuchen von Mikroorganismen direkt auf den Materialoberflächen basierend auf geeigneten Mikroskopietechniken. Die Fähigkeit der Anhaftung der Organismen beeinflusst neben zusätzlichen Faktoren wesentlich das Biofilmwachstum. Mit dem Wissen über die mikrobielle Zusammensetzung der als Inokulum verwendeten Proben könnte mit molekularbiologischen Methoden beispielsweise der Fluoreszenz-in-Situ-Mikroskopie ein direkter Nachweis von Biofilmwachstum und eine Beurteilung der Biofilmentwicklung gekoppelt mit der Konfokalen Mikroskopie erfolgen. Eine weiterführende Entwicklung der Methoden für die Bewertung der Aufwuchsträger mit Optimierung der Fehlerquote kann als weiterer Ansatz für anschließende Versuche verstanden werden. Mit der Entwicklung von Methoden zur Desorption von Zellen von der Materialoberfläche mit dem Ziel die Zellausbeute zu maximieren, erhöht die Ergebnissicherheit der angewendeten Methoden. Ein möglicher weiterer Ansatz zur Beurteilung der Materialeignung könnten Untersuchungen zur Biokorrosion der Materialien sein.

## 8 Zusammenfassung

Die Zielstellung der Bewertung der textilen Aufwuchsträger aus Basalt-, Glas-, und PES- Gewebe hinsichtlich der Eignung als Aufwuchsträgern basierend auf den Methoden der grundlegenden Beschreibung der Biofilmentwicklung, die Bestimmungen der aufgewachsenen Gesamtbiomassen auf den Geweben und der Zellzahlen der Biofilme konnte einführend in die Thematik erreicht werden. Die Basalt- und die Glasgewebe als Aufwuchsträger in Gewebeform können auf Grundlage der angewendeten Methoden als geeignete Aufwuchsmaterialien bewertet werden. Ein Unterschied in der Biofilmentwicklung konnte bei dem PES- Gewebe mit der Bestimmung der Gesamtmasse festgestellt und mit der am geringsten aufgewachsenen Biomasse (trotz des Hintergrundes der biologisch abbaubaren Eigenschaft des Polyesters) als weniger geeignet eingestuft werden. Für den Vergleich der Materialien hinsichtlich der Eignung der Gewebe als Aufwuchsträger müssen bedingt durch die unbekannte mikrobielle Zusammensetzung der Berieselungswässer, eine mögliche Ergebnisverfälschung durch Materialverlust, das geringe Probenmaterial (Biomassen) und der geringfügigen Abweichungen der Materialeigenschaften (z.B. die Neigung zu Filamentbrüchen) die Ergebnisse als kritisch angesehen werden. Aufgrund der unbekannten mikrobiellen Zusammensetzung der Berieselungswässer können die Adhäsionskräfte nur im Ansatz nachvollzogen werden. Die Untersuchungen des Biofilmwachstums auf flacher und strukturierter Materialoberfläche des Basaltgewebes zeigten einen geringfügigen Unterschied in den bestimmten Biomassen und Zellzahlen. Eine Ursache könnte in dem zu geringem Strukturunterschied der Gewebe sein. Möglicherweise gleichen hydrodynamische Effekte die minimale Oberflächenvergrößerung der strukturierten Oberfläche wieder aus. Generell konnte der Einfluss von hydrodynamischen Effekten ausgehend von einem kleinen Magnetstäbchen auf die durchgeführten Aufwuchsversuche als stark angenommen werden. Die Biofilmentwicklung auf dem Basaltgewebe mit den angeklebten Rändern verdeutlicht diese Tatsache, da mit der Ablösung der für die Stabilisierung der Gewebestruktur notwendigen Klebestreifen der Einfluss der Scherkraft maximal auf die instabile Gewebestruktur wirken konnte. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Biofilmwachstum auf den

Gewebe basierend auf dem Berieselungswasser von Vow allgemeine Parallelen zu dem Biofilmwachstum der CHM-Probe aufwies. Die von der Randseite beginnende Biofilmentwicklung und das Verteilungsmuster mit der stärksten Biofilmausprägung im Scheitelpunkt der Gewebe mit tendenzieller Abnahme der Biofilmdicke in Richtung Gewebeaufhängung. Der zeitliche Rückstand des Biofilmwachstums basierend auf den Inokulum von Vow konnte eindeutig auf den Basalt- und Glasgewebe nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeichneten sich auf dem PES-Gewebe nicht so deutlich ab. Ein Vergleich der Ergebnisse hinsichtlich der Herkunft der Berieselungswässer – CHM und Vow - ist basierend auf der Vielzahl von unbekannten Faktoren nicht möglich. Allerdings können die Aufwuchsversuche Anhaltspunkte hinsichtlich des Biofilmwachstums und Ansätze für die Ursachen der Leistungsunterschiede der Abluftreinigungsanlagen liefern. Als signifikanter Unterschied ist das zeitlich verzögerte Biofilmwachstum zu nennen. Mit der Bestimmung der Gesamtbiomassen konnte festgestellt werden, dass die Basaltgewebe von CHM und Vow die höchste Biomasse aufwiesen, gefolgt von den Glasgeweben. Die geringste nachgewiesene Gesamtbiomasse wurde bei beiden PES-Geweben festgestellt. Es kann angenommen werden, dass der Einfluss der Oberflächenstruktur auf die Biofilmentwicklung sehr gering ist. Möglicherweise überwiegt die Einflussnahme der hydrodynamischen Effekte. Mit der Acridinorangefärbung konnten Unterschiede in dem Färbeverhalten der Mikroorganismen festgestellt werden. Die Biofilmproben von CHM wiesen unter blauem Anregungslicht (Wellenlänge 490 nm) eine vollständige Färbung der Zellen auf. Im Vergleich zu den Vow- Biofilmproben konnte eine unvollständige Annahme des Farbstoffes beobachtet werden. Als wesentliche Erklärungen können die verschiedenen Färbemechanismen von Zellen mit dem Hintergrund der unbekannten mikrobiellen Zusammensetzung genannt werden. Die Verwendung der untersuchten Materialien als Aufwuchsträger in der Praxis kann in Abhängigkeit der benötigten Materialeigenschaften ausgewählt werden. Die Vorteile der Basaltfaser sind in den hervorragenden mechanischen Eigenschaften z.B. Zugfestigkeit, geringe Umweltbelastung bei der Produktion und Verarbeitung der Basaltfasern, Korrosionsbeständigkeit und der höhere chemische Beständigkeit gegenüber Wasser und anderen Chemikalien zu nennen. Der Nachteil der Basaltfaser liegt in dem je nach Verarbeitungsprozess typischen Filamentbruch mit Abspreizung der Filamente. Der Vorteil der Glasfasern liegt in dem geringen Kostenfaktor. Als Nachteil

sind die gesundheitlichen Gefährdungen durch Glasfasern z.B. beim Einatmen zu nennen. Polyester ist ein biologisch abbaubarer Kunststoff, weist allerdings den Nachteil des Verbrauchs des Erdöls für den Herstellungsprozess auf.

## Literaturverzeichnis

Ackermann, Wilfried et al.: RÖMPP Lexikon Biotechnologie und Gentechnik - 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1999

Alexander, Steve und Strete, Dennis: Mikrobiologisches Grundpraktikum - Ein Farbatlas (Pearson Studium - Biologie) - 1. Aufl. Hallbergmoos : Addison-Wesley Verlag, 2006

Blackman, Isabel et al.: Growth of *Listeria monocytogenes* as a Biofilm on Various Food-Processing Surfaces In: Journal of Food Protection® (1996), Nr. 8, S. 827- 831

Breitmaier, Eberhard und Jung, Günther: Organische Chemie-Grundlagen, Verbindungsklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur, Naturstoffe, Syntheseplanung, Nachhaltigkeit - 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2012

Fuchs, Georg: Allgemeine Mikrobiologie - 8. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2007

Giessmann, Andreas: Substrat- und Textilbeschichtung: Praxiswissen für Beschichtung - und Kaschientechnologie – 2. Aufl. Berlin: Springer Verlag, 2010

Horton, Robert et al.: Biochemie – 4. Aufl. Hallbergmoos: Pearson Verlag, 2008

Höll, Karl: Wasser: Nutzung im Kreislauf: Hygiene, Analyse und Bewertung – 9. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter & Co.KG, 2010

Kaden, Ren: Mikrobiologische Gewässeranalytik: Am Beispiel der Untersuchung einer Trinkwassertalsperre – Hamburg: Diplomica Verlag, 2009

Kalweit, Andrea: Handbuch Für Technisches Produktdesign: Material und Fertigung, Entscheidungsgrundlagen Für Designer und Ingenieure – 2. Aufl. Berlin: Springer Verlag, 2012

Koslowski, Hans J.: Chemiefaserlexikon : Begriffe. Zahlen. Handelsnamen - 12. Aufl. Frankfurt am Main: Deutscher Fachverlag, 2008

Liefeith, Klaus et al.: Schlussbericht der Forschungsstelle(n) Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e. V. und Textilforschungsinstitut Thüringen-Vogtland e.V.: Entwicklung von 3D-Textilien mit sehr großen reaktiv wirksamen Oberflächen für modulare Bioreaktorsysteme zur biologischen Abwasserreinigung, 2011



Lienhard, Julian et al. Atlas Kunststoff + Membranen: Werkstoffe und Halbzeuge Formfindung und Konstruktion - 1. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter & Co.KG, 2010

Luttmann, Werner: Der Experimentator: Immunologie – 4.Aufl. Berlin: Springer-Verlag, 2014

Lüttgens, Günter: Praxislexikon statische Elektrizität: 1600 Begriffe zu Gefahren, Störungen und Anwendungen -1. Aufl. Renningen: expert-Verlag, 2000

Marquardt, Kurt et al.: Rein- und Reinstwasseraufbereitung: Band 391, Kontakt & Studium Verfahrenstechnik - 1. Aufl. Renningen: expert-Verlag, 1994

Nikolaos, Andreas et al.: Wasser: Chemie, Mikrobiologie und nachhaltige Nutzung - 1. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter & Co.KG, 2011

Oltmanns, Ralf: Fluoreszenzfarbstoffe zur Vitalitätsbestimmung von Mikroorganismen - 1996. - S 90 Aachen, Technische Hochschule , Medizin- Biomedizinische Technik, Diplomarbeit, 1996

Pfeil, Achim et al.: Biologisch abbaubare Kunststoffe: Band 425 Kontakt & Studium Umwelttechnik - 1. Aufl. Renningen- Malsheim: Expert Verlag, 1994

Prouty, A.M. et al.: Comparative Analysis of *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* Biofilm Formation on Gallstones and on Glass In: American Society for Microbiology. Infection and Immunity (2003), Vol. 71, S. 7154 - 7158

Raith, Wilhelm: Elektromagnetismus - 9. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter & Co.KG, 2006

Remde, Achim et al.(Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)): Mikrobiologische Charakterisierung aquatischer Sedimente: Methodensammlung – 1. Aufl München: Oldenbourg Industrieverlag, 1998

Richter, Gerhard: Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken - 6. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag, 2003

Roeske, Wolfgang: Trinkwasserdesinfektion: Grundlagen, Verfahren, Anlagen, Geräte, Mikrobiologie, Chlorung, Ozonung, UV-Bestrahlung, Membranfiltration, Qualitätssicherung - Ritter, Klaus (Hrsg.) 2. Aufl. München: Oldenbourg Industrieverlag, 2007

Rost, F.W.D.: Fluorescence Microscopy: Band 2 - 1. Aufl. Cambridge: Cambridge University Press, 1993

Rumpf, Anna Katharina: Effekte elektrischer Polarisierung leitender Oberflächen auf die bakterielle Primäradhäsion und Biofilmentwicklung - 2009.- Universität Duisburg-Essen, Fachbereich Chemie, Doktorarbeit, 2009

Schmid, Thomas: Laserinduzierte photoakustische Spektroskopie als Sensorprinzip: Anwendungen in der Prozess- und Umweltanalytik - 1. Aufl. Berlin: TENEA-Verlag, 2003

Schmitt, Peter: Fachwörterbuch Technik und angewandte Wissenschaften - 5. Auflage München: Langenscheidt Fachverlag, 2004

Steinbüchel, Alexander et al.: Mikrobiologisches Praktikum: Versuche und Theorie 2.Aufl. Berlin: Springer - Verlag, 2013

Venzmer, Helmuth: Altbausanierung 2: Biofilme und andere funktionale Baustoffoberflächen - 8. Dahlberg Kolloquium Berlin: Beuth Verlag, 2008

Vogel, Christian. Persönliche Mitteilung, STFI Materialentwicklung / Prüfverfahrensentwicklung, 2014

Wallbaum, Reiner et al.: Handbuch für technisches Produktdesign- 1.Aufl. Berlin: Springer Science & Business Media, 2006

Ziegler, M. (INNOVENT e.V. Technologieentwicklung Jena): Antimikrobielle Ausrüstung von Oberflächen. In: 9. Thüringer Grenz- und Oberflächentage und 9. Thüringer Biomaterial-Kolloquium, Tagungsband Jena (2013), S.181-184.

URL-1: Ibold, Stefan: Herstellung von Kunststoffen-Polykondensation. URL: <http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/kunststoffe/pkond.htm>, verfügbar am 15.09.2014

URL-2: Suter Kunststoffe AG (Verfasser unbekannt): Basalt-Fasern und Gewebe. URL: <http://www.swiss-composite.ch/pdf/I-Basalt-Fasern-Gewebe.pdf>, verfügbar am 15.09.2014

URL-3: R&G Datenblatt (Verfasser unbekannt): Glasfasern URL: <http://www.rg.de/wiki/Glasfasern>, verfügbar am 15.09.2014

URL-4: Flemming, Kurt et al., Universität Duisburg-Essen: Biofilme: eine Gefahr für das Trinkwasser?. URL: [https://www.uni-due.de/imperia/md/content/biofilm-centre/drinking\\_water.pdf](https://www.uni-due.de/imperia/md/content/biofilm-centre/drinking_water.pdf), verfügbar am 15.09.2014

## Anhang

### A1: Ladungsversuche an den Geweben

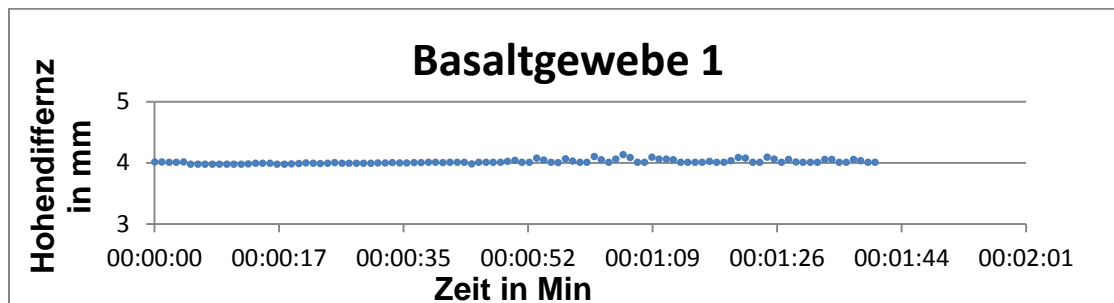
**Tabelle A1**      **Untersuchung zur triboelektrischen Materialaufladbarkeit und Oberflächenpotential der Gewebe**

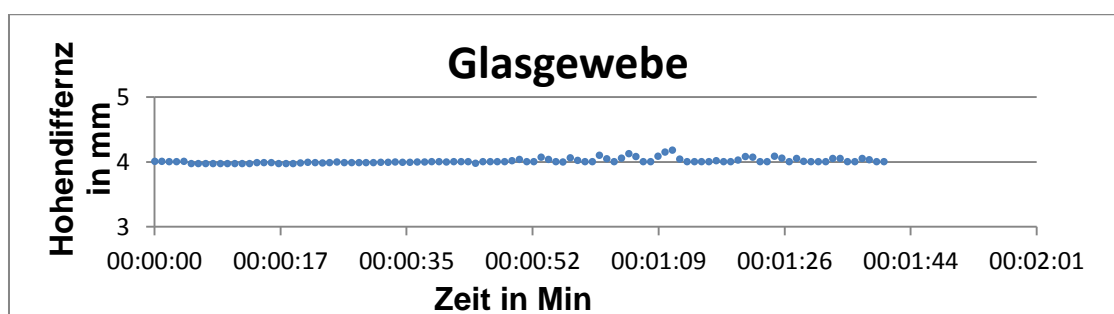
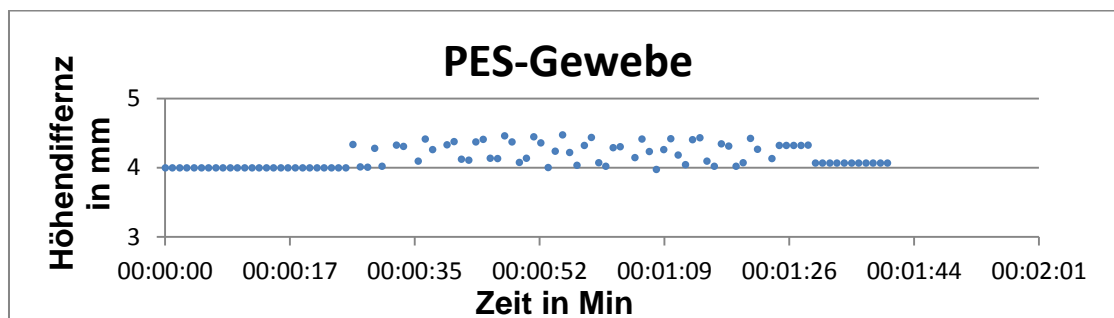
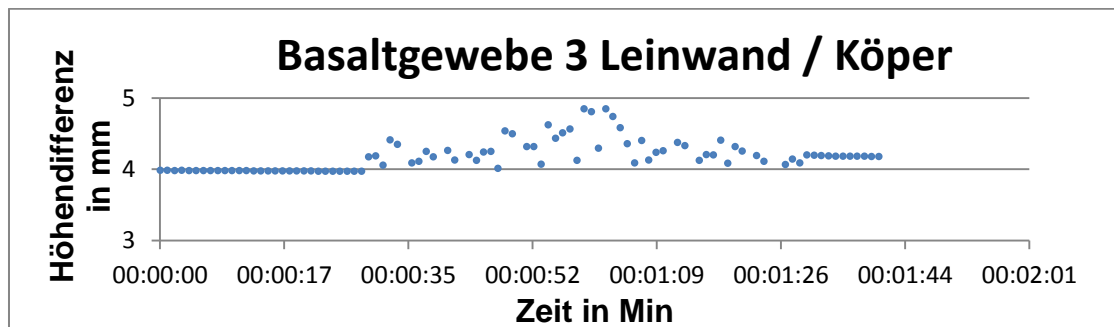
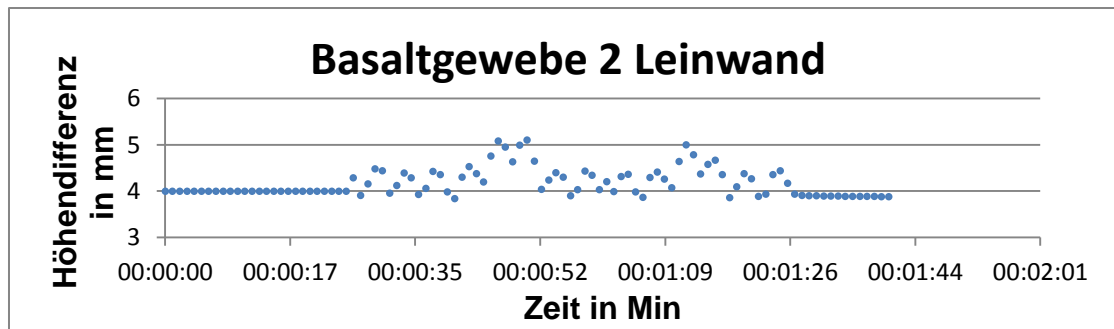
Probe	Reibmaterial: Polyamid-Vlies Oberflächenpotential
Basalt	+ 6,7 kV
Glas	< + 1 kV
PES	- 1,5 kV

Die Tendenz der Aufladbarkeit der untersuchten Gewebe wurde bei der Versuchsdurchführung mit dem Polyamid-Vlies deutlich.

### A2: Sensorgesteuerte Rauigkeitsmessungen der Gewebe

Auf jedem Gewebe wurde eine Position mit 4 cm Wegstrecke mit sensorgesteuerter Messtechnik bestimmt.





**Abbildung A2 Zusammenfassung der Rauigkeitsmessungen der Gewebe**

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 15. September 2014

Stefanie Urbanek